

Neue Inhibitoren der Proteinkinasen *Pf*GSK-3 und RET

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Wiebke Brandt
aus Hannover

1. Referent:	Professor Dr. Conrad Kunick
2. Referent:	Professor Dr. Ingo Ott
eingereicht am:	23.09.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am:	19.11.2009

Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Brandt, W., Ratin, M., Preu, L., Meijer, L. and Kunick, C.: *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: a potential target in malaria treatment. (Poster) DPhG-Jahrestagung, Bonn (2008).

Brandt, W., Mologni, L., Lemcke, T., Preu, L. and Kunick, C.: 4-Aryl-2-alkylthionicotinonitriles as novel RET kinase inhibitors. (Poster) DPhG-Jahrestagung, Jena (2009).

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2006 bis September 2009 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,

dem ich an dieser Stelle für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des Themas sowie für seine engagierte Betreuung und Unterstützung sehr herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Ingo Ott

für die Übernahme des Koreferats.

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1	Einleitung	1
2	<i>PfGSK-3</i>	2
2.1	<i>Plasmodium falciparum</i>	2
2.1.1	Einteilung und Bedeutung	2
2.1.2	Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	2
2.2	Möglichkeiten und Probleme der Prophylaxe und Therapie.....	3
2.2.1	Wirkstoffe in der Antimalariatherapie	3
2.2.2	Neue Wirkstoffe	5
2.3	Proteinkinasen als potentielle Targets für die antiplasmodiale Chemotherapie	8
2.3.1	<i>Pfnek-1</i>	8
2.3.2	<i>PfPK7</i>	9
2.3.3	Homologe Kinasen der Cyclin-abhängigen Kinasen	10
2.4	<i>PfGSK-3</i> im Vergleich zur humanen GSK-3	11
2.4.1	Struktur und Regulation der GSK-3	11
2.4.2	Bedeutung bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen	12
2.4.3	Bekannte GSK-3-Inhibitoren	13
2.4.4	Aminosäuresequenz und Tertiärstruktur der <i>PfGSK-3</i>	15
2.4.5	Expression und Lokalisation im Erythrozyten	17
2.4.6	Mögliche Funktionen von <i>PfGSK-3</i>	18
2.4.7	Kinaseaktivität und Inhibition der <i>PfGSK-3</i>	19
3	RET.....	21
3.1	Aufbau und Funktion.....	21
3.2	RET-assoziierte Erkrankungen	22
3.3	Niedermolekulare RET-Inhibitoren.....	23
4	Ziel der Arbeit.....	26
5	Synthesen.....	31
5.1	Synthese der Thioxopyridine, Thioxochinoline und Thioxonaphthyridine	31

5.1.1	Synthese der Thioxopyridine	31
5.1.1.1	Einführung des Schwefels durch Thiophenol	31
5.1.1.2	Einführung des Schwefels durch Cyanthioacetamid	34
5.1.1.3	Oxidationsschritt bei der Synthese von Thioxopyridinen	36
5.1.1.4	Syntheseversuche zur Darstellung von 6-Amino-4-(2,6-dichlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril	38
5.1.2	Synthese der Thioxochinoline und Thioxonaphthyridine	39
5.2	Synthese der Thienopyridine	41
5.2.1	Alkylierung und Thorpe-Ziegler-Reaktion	41
5.2.2	Umsetzung der Thioxopyridine bzw. Thioxochinoline mit Alkylhalogeniden	42
5.2.3	Zuordnung der Signale in den ¹ H-NMR-Spektren der Verbindungen 42 , 43 , 44 und 45	47
5.3	Modifizierung des Moleküls auf der Seite des Thiophens durch Zyklisierung	49
5.3.1	Thienopyridin-2-carbonitrile 44 als Ausgangsstoffe	49
5.3.1.1	Reaktion mit Ameisensäure/Acetanhydrid	49
5.3.1.2	Reaktion mit Dimethylformamid-Dimethylacetal (DMF-DMA) und Anilinen	50
5.3.2	2-Aroylthienopyridine 42 als Ausgangsstoffe	54
5.3.2.1	Friedländer-Synthese	54
5.3.2.2	Reaktion mit Formamid	58
5.4	Umwandlung des Ketons in ein Oxim	59
5.5	Synthese der Pyrazolopyridine	60
5.6	Synthese der Pyridin-3,5-dicarbonitrile, 5,6,7,8-Tetrahydrochinolin-3-carbonitrile und -naphthyridin-3-carbonitrile	67
5.6.1	Verbindungen mit Ketogruppe in der Seitenkette	67
5.6.2	Verbindungen ohne Ketogruppe in der Seitenkette	70
5.6.3	Besonderheiten in der ¹ H-NMR-Analytik	72
6	Biologische Aktivität	74
6.1	<i>Pf</i> GSK-3 und Säugetier-GSK-3	74
6.1.1	Allgemeine Betrachtungen zur Inhibition der Kinaseaktivität durch Thienopyridine	74
6.1.2	Kinase-inhibitorische Aktivität der 2-Aroylthienopyridine	75
6.1.3	Kinase-inhibitorische Aktivität der Thienopyridin-2-carbonitrile	80

6.1.4	Sonstige.....	82
6.1.5	Struktur-Wirkungsbeziehungen und Docking-Studien	83
6.2	RET.....	93
6.2.1	Inhibition der RET-Kinaseaktivität.....	93
6.2.2	Selektivität einzelner Verbindungen.....	95
6.2.3	Hemmung des Zellwachstums.....	97
6.2.4	Docking-Studien	98
7	Zusammenfassung	104
8	Summary	107
9	Experimenteller Teil.....	110
9.1	Allgemeines	110
9.2	Synthesen und analytische Daten	114
9.3	Biologische Daten	223
9.3.1	GSK-3-Assays	223
9.3.2	Kinaseassays zur Untersuchung der potentiellen RET-Inhibitoren	226
9.3.3	Zelltests	226
9.4	Docking.....	228
9.4.1	<i>Pf</i> GSK-3.....	228
9.4.2	RET.....	229
10	Literaturverzeichnis.....	230

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ABL	<i>Abelson tyrosine kinase</i>
ALCL	<i>anaplastic large-cell lymphoma</i>
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AMP-PNP	Adenylymidodiphosphat
ACP	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
ber.	berechnet
br	Signal liegt verbreitert vor
BSA	bovines Serumalbumin
CDCl ₃	Deuterochloroform
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CK-1	Casein Kinase-1
CML	Chronisch-Myeloische Leukämie
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
DAD	<i>dioden array detector</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarisation transfer</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMF-DMA	<i>N,N</i> -Dimethylformamid-Dimethylacetal
DMSO- <i>d</i> ₆	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D ₂ O	Deuteriumoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EI	Elektronenstoß-Ionisation

ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ePK	eukaryotische Proteinkinase
ERK2	<i>extracellular signal-regulated kinase-2</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
gef.	gefunden
GFR α	GDNF- <i>family receptor</i> α
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
h	Stunde(n)
Hal	Halogen
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HsGSK-3	<i>Homo sapiens</i> Glycogen Synthase Kinase-3
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration</i> 50%
IR	Infrarot
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
KBr	Kaliumbromid
KOH	Kaliumhydroxid
λ_{max}	Absorptionsmaximum
Lit.	Literatur
m	Multipllett
MEN2	multiple endokrine Neoplasie Typ 2
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
M _r	Molare Masse
MTC	<i>medullary thyroid carcinoma</i>

m/z	Masse pro Ladungseinheit
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NRTK	Nicht-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase
Ox.	Oxidation
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PfGSK-3	<i>Plasmodium falciparum</i> Glycogen Synthase Kinase-3
pIC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus des IC ₅₀ -Wertes
ppm	<i>parts per million</i>
PTC	<i>papillary thyroid carcinoma</i>
q	Quartett
quart.	quartär
quin	Quintett
RET	<i>rearranged during transfection</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
SRC	<i>v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog</i>
t	Triplett
tert.	tertiär
t _M	Totzeit
t _{M+N}	Gesamtretentionszeit
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMS	Tetramethylsilan
t _N	Nettoretentionszeit
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
W	Watt

1 Einleitung

Substanzen ähnlicher Struktur können biologische Aktivitäten an verschiedenen Zielstrukturen (*Targets*) aufweisen. In dieser Arbeit werden zwei Substanzklassen auf ähnlichen Synthesewegen dargestellt und deren biologische Aktivität an zwei verschiedenen Targets, *Plasmodium falciparum* Glycogen Synthase Kinase-3 (*PfGSK-3*) und *rearranged during transfection* (RET) Kinase, untersucht. Bei diesen Targets handelt es sich um Proteinkinasen. Proteinkinasen sind Enzyme, die mit ATP als Cosubstrat Phosphatreste auf andere Proteine übertragen und in viele physiologische Vorgänge des Organismus eingebunden sind. Sie regulieren wichtige zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose. Eine Dysfunktion der Proteinkinasen wird mit der Entstehung inflammatorischer und hyperproliferativer Erkrankungen wie Krebs, rheumatoider Arthritis, Asthma sowie kardiovaskulärer und neurologischer Erkrankungen in Verbindung gebracht.^{1,2}

Die Proteinkinasen werden in zwei Gruppen unterteilt, die nach den Aminosäuren benannt sind, die jeweils phosphoryliert werden: Die Serin/Threonin-Kinasen und die Tyrosinkinasen, die sich wiederum in Nicht-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen (NRTK) und Rezeptortyrosinkinasen (RTK) aufteilen.³

Bei der *PfGSK-3* handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*, RET gehört zu den Rezeptortyrosinkinasen und wird mit der Entstehung bestimmter Schilddrüsenkarzinome in Verbindung gebracht. Die beiden Proteinkinasen werden in den folgenden Kapiteln eingehender beleuchtet.

2 PfGSK-3

2.1 *Plasmodium falciparum*

2.1.1 Einteilung und Bedeutung

Plasmodium falciparum gehört wie *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* zu den humanpathogenen Malariaerregern. Alle vier befinden sich wie zum Beispiel auch *Toxoplasma gondii* in der Ordnung der Coccidia (Kokzidien), die zu den Apicomplexa (Sporentierchen) zählen.

Laut WHO gab es im Jahr 2006 weltweit schätzungsweise 247 Millionen Malariafälle, die meisten davon in den afrikanischen Ländern. In ungefähr einer Million der Fälle verlief die Erkrankung tödlich. *Plasmodium falciparum* ist der Erreger der Malaria tropica, die die meisten dieser Todesfälle verursacht, da sie am häufigsten vorkommt und auch die schwerste Verlaufsform aufzeigt.⁴

2.1.2 Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Im menschlichen Organismus findet die asexuelle Vermehrung des Malariaerregers statt. *Plasmodium falciparum* wird zunächst durch den Stich der weiblichen Anophelesmücke übertragen. Diese trägt die Sporozoiten in ihrer Speicheldrüse. Die Sporozoiten wandern dann in die Leber und entwickeln sich dort intrazellulär zu Schizonten, die bis zu 40 000 Merozoiten beinhalten. Die Merozoiten gelangen nach Lysis des Hepatozyten in die Blutbahn und befallen dort rote Blutkörperchen. Im erythrozytären Zyklus entwickeln sich die Merozoiten über das Ringstadium zum Trophozoiten, der sich dann zum Blutschizonten mit 20-32 Merozoiten umwandelt. Nach Lysis des Erythrozyten gelangen diese wiederum in die Blutbahn und können erneut in Erythrozyten eindringen, wo sie den Zyklus abermals durchlaufen. Bei Ruption der Erythrozytenmembran gelangen außerdem Zelltrümmer des roten Blutkörperchens und Stoffwechselabfälle des Parasiten in die Blutbahn. Bemerkenswert ist, dass dieser Vorgang bei allen befallenen Erythrozyten synchronisiert ist, so dass jeweils zum gleichen Zeitpunkt eine große Menge an schädlichen Stoffen in die menschliche Blutbahn gelangt und die bekannten Fieberanfälle auslöst.

Einige Merozoiten wandeln sich im Erythrozyten auch zu männlichen und weiblichen Geschlechtsformen um, die ebenso in die Blutbahn gelangen und von einer Anophelesmücke bei ihrer Blutmahlzeit wieder aufgenommen werden können. In der Mücke finden dann die Zygotenbildung und die sexuelle Entwicklung statt. Schließlich entstehen wiederum mehrere tausend Sporozoiten, die sich in der Speicheldrüse sammeln, um bei der nächsten Blutmahlzeit der Mücke abermals einen menschlichen Organismus zu infizieren.^{5,6}

2.2 Möglichkeiten und Probleme der Prophylaxe und Therapie

Zur Bekämpfung der Malaria werden einerseits Präventionsmaßnahmen wie das Benutzen von Moskitonetzen (*long-lasting insecticidal nets*, LLIN) und das Anwenden von Insektiziden in Räumen (*indoor residual spraying of insecticides*, IRS) von der WHO empfohlen.⁴ Ein Impfstoff gegen *Plasmodium falciparum* steht zur Zeit noch nicht zur Verfügung. Zur Chemoprophylaxe wie auch zur Therapie werden Wirkstoffe aus verschiedenen Substanzklassen angewendet.

2.2.1 Wirkstoffe in der Antimalariatherapie

Die Wirkstoffe, die bis zur Jahrtausendwende zur Behandlung der Malaria tropica zur Verfügung standen, kommen aus folgenden Substanzgruppen⁷:

- 4-Aminochinoline (Chloroquin und Amodiaquin)
- Arylaminoalkohole (Chinin, Mefloquin, Lumefantrin)
- 8-Aminochinoline (Primaquin)
- Antifolate (Sulfadoxin, Pyrimethamin, Proguanil und Chlorproguanil)
- Antibiotika (Tetracycline)
- Hydroxynaphthochinone (Atovaquon).

Durch Mutationen in bestimmten Genen des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* hat dieser inzwischen gegen fast alle oben genannten Wirkstoffe resistente Stämme entwickelt. Diese Mutationen können zum Beispiel Punktmutationen in den Genen der Zielstrukturen sein oder Mutationen und Amplifikationen von Genen bestimmter Transportproteine, die die Wirkstoffe von dem Wirkort entfernen. Zu diesen

Transportproteinen gehören der Chloroquin-Resistenz-Transporter (CRT) und der *P. falciparum* multi drug resistance 1 (PfMDR1)-Transporter.^{8,9}

Artemisinin (**1**) ist ein Sesquiterpen-1,2,4-trioxan, das aus *Artemisia annua*, dem Einjährigen Beifuß, gewonnen wird, und eine hohe antiplasmodiale Wirkung hat. Der Wirkmechanismus ist nicht komplett aufgeklärt, jedoch ist die Endoperoxid-Struktur, die Artemisinin besitzt, offensichtlich essentiell für die Wirkung, da Desoxyartemisinin, in dem keine Ozonidstruktur vorhanden ist, komplett inaktiv gegenüber dem Malariaerreger ist.¹⁰

Die besser wasserlöslichen Artemisinin-Derivate Artemether (**2**) und Artesunat (**3**) sind seit dem Jahr 2000 von der WHO als ACT (artemisinin-based combination therapy) in den meisten afrikanischen Ländern zur Medikation der ersten Wahl bei der Behandlung der Malaria tropica ernannt worden. Folgende Kombinationen werden empfohlen¹¹:

- Artemether/Lumefantrin (Coartem[®], Riamet[®] in Europa, Novartis)
- Artesunat und Amodiaquin
- Artesunat und Sulfadoxin/Pyrimethamin
- Artesunat und Mefloquin.

Durch die Kombination mit anderen Antimalariamitteln soll einer Resistenzbildung gegen Artemisinin-Derivate vorgebeugt werden. Artemisinine haben außerdem eine sehr kurze Halbwertszeit, so dass eine Kombination mit einem länger wirksamen Wirkstoff plausibel ist, um die restlichen Parasiten abzutöten und einen Rezidiv zu verhindern. Nachteilig ist außerdem, dass es sich bei den Artemisininen um Naturstoffe handelt, die teuer sind, verunreinigt sein können und deren Verfügbarkeit aufgrund begrenzter Anbauflächen eingeschränkt ist.

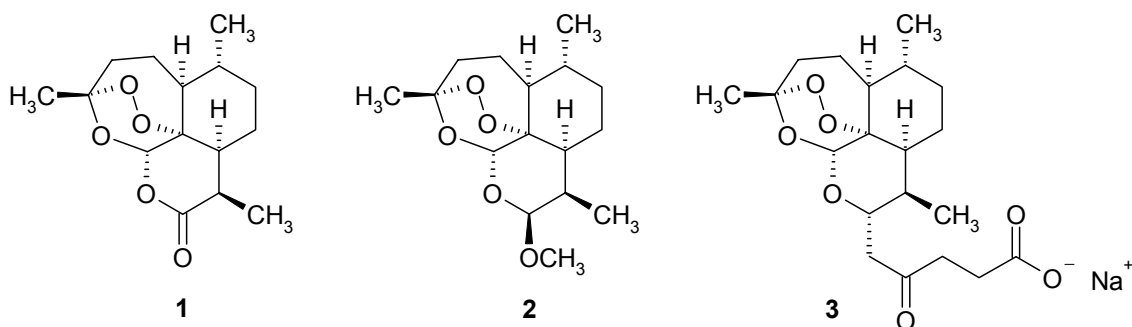


Abbildung 2-1: Artemisinin-Derivate

Aus diesen Gründen wird seit einigen Jahren an der Darstellung synthetischer Endoperoxide gearbeitet. Vennerstrom et al. synthetisierten das OZ 277 (**4**), welches bis in die klinische Entwicklung gelangte.¹² Leider stellte sich heraus, dass die Bioverfügbarkeit bei Malariapatienten um ein Drittel geringer war als bei gesunden Probanden, und die Entwicklung wurde abgebrochen.⁷ Inzwischen steht ein weiteres synthetisches Ozonid (OZ 439) kurz vor der klinischen Entwicklung.¹³

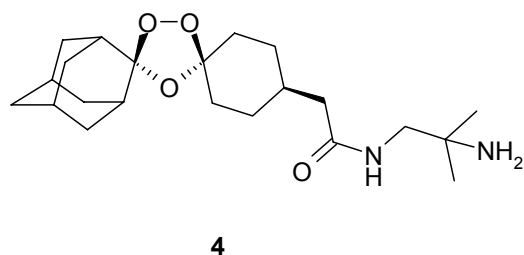


Abbildung 2-2: Das synthetische Ozonid OZ-277

Eine signifikante Resistenzbildung gegen Artemisinin-Derivate ist bis jetzt nicht beobachtet worden. Afonso et al. konnten allerdings eine stabile Resistenz gegen Artemisinin und Artesunat bei einem Plasmodien-Stamm, der Nagetiere befällt, induzieren.¹⁴ Die Gefahr der Entstehung resistenter *P. falciparum*-Stämme ist somit nicht zu unterschätzen. Sollte es dazu kommen, gibt es zur Zeit keine wirksamen Alternativen zur Behandlung. Die Identifizierung neuer Wirkstoffe mit neuartigem Wirkmechanismus ist deswegen dringend erforderlich.

2.2.2 Neue Wirkstoffe

In vielen Substanzgruppen der bekannten Malariamittel wurden neue Wirkstoffe entwickelt, so zum Beispiel das Pyronaridin (**5**) und das Piperaquin (**6**) in der Gruppe der 4-Aminochinoline. Diese beiden Substanzen stehen als Kombinationspräparate (Pyronaridin/Artesunat und Piperaquin/Dihydroartemisinin) kurz vor der Zulassung.¹³

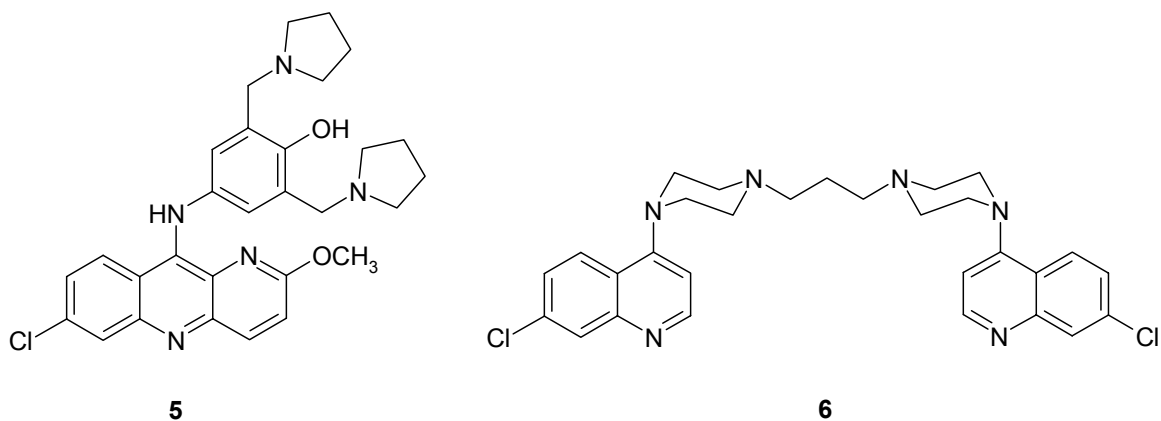


Abbildung 2-3: Neue 4-Aminochinoline in der klinischen Entwicklung

Substanzen der allgemeinen Strukturformel **7** sind Inhibitoren des Cytochrom bc_1 -Komplexes der Atmungskette und besitzen damit einen ähnlichen Wirkmechanismus wie das Atovaquon.¹⁵ Ein Vertreter dieser 4-Pyridone steht kurz vor der klinischen Entwicklung.¹³

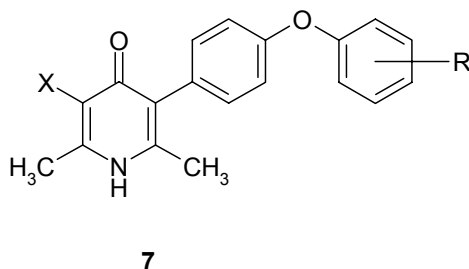


Abbildung 2-4: Allgemeine Strukturformel antiplasmodialer 4-Pyridone

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen neuen Wirkstoffen zielen die folgenden Substanzen auf andere Zielstrukturen ab als die bekannten Malariamittel.

Fosmidomycin (**8**) greift in den Isoprenoid-Stoffwechsel ein. Isoprenoide zur Synthese von zum Beispiel Sterolen werden in Säugetieren auf dem Mevalonatweg aus Acetyl-CoA hergestellt. In einigen Bakterien, Algen und Pflanzen wurde ein mevalonatunabhängiger Syntheseweg gefunden. Hier entsteht 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) aus Glyceraldehyd-3-phosphat und Pyruvat und wird dann durch die Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktase weiter umgewandelt. Fosmidomycin hemmt dieses Enzym und ist als antibakterieller Wirkstoff bekannt. Auch *Plasmodium falciparum* verfügt über den DOXP-

Syntheseweg. Für Fosmidomycin konnte eine antiplasmodiale Wirkung nachgewiesen werden.¹⁶ In klinischen Studien stellte sich heraus, dass Fosmidomycin zwar schnell wirkt, die Rezidivrate jedoch relativ hoch ist. Aus diesem Grund wurden auch Kombinationen von Fosmidomycin mit Clindamycin und Artesunat in die klinischen Studien aufgenommen.^{17,18}

Bisammoniumderivate wie T3 (**9**) sind Cholin-Analoga und hemmen die Biosynthese von Phosphatidylcholin. Die Synthese dieser Membranbestandteile ist für *P. falciparum* essentiell und findet nur in infizierten Erythrozyten statt. T3 wies antiplasmodiale Aktivität im niedrigen nanomolaren Bereich auf.¹⁹

Parfuramidin (DB289, **10**) wurde von der Firma Immtech International entwickelt und ist ein Prodrug, das durch Biotransformation in der Leber zu Furamidin (DB75, **11**), einem Diamidin-Derivat, metabolisiert wird. Der Wirkmechanismus der Diamidine ist nicht geklärt, diskutiert wird eine Beeinflussung der Hämdegradation, der mitochondrialen Atmungskette oder der DNA-Replikation von *Plasmodium falciparum*. Die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von DB289 wurde durch eine Phase-II-Studie belegt.²⁰

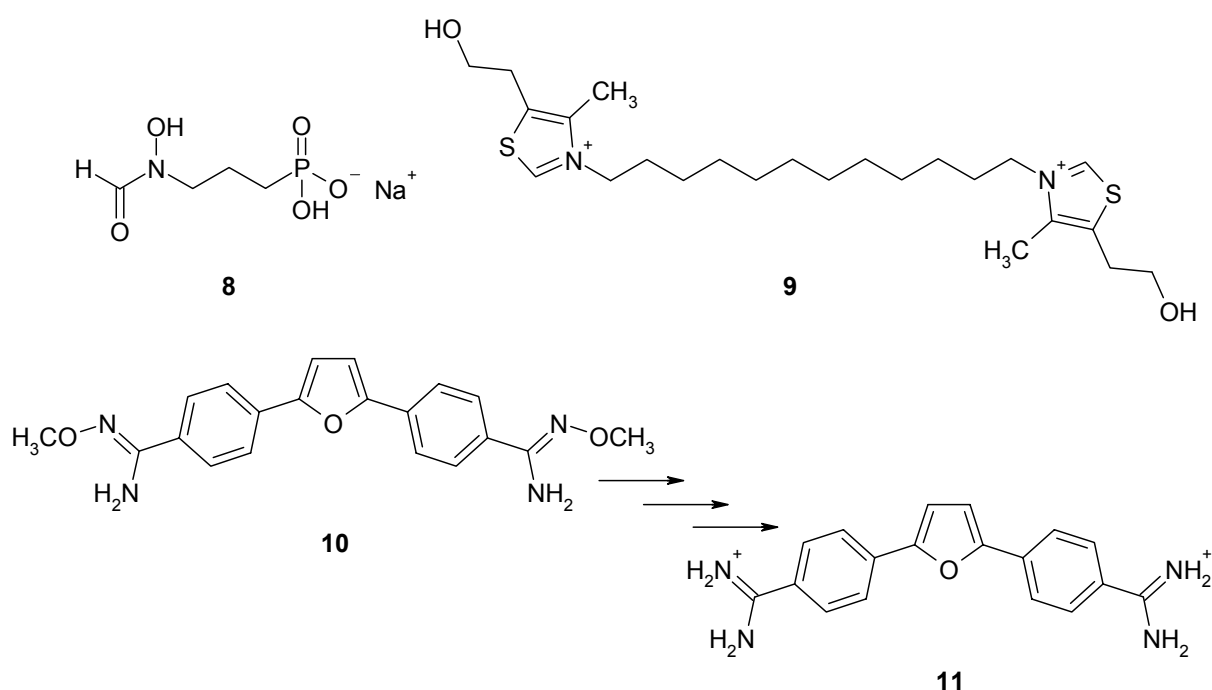


Abbildung 2-5: Antiplasmodiale Wirkstoffe mit neuem Wirkmechanismus

2.3 Proteinkinasen als potentielle Targets für die antiplasmodiale Chemotherapie

Die typischen eukaryotischen Proteinkinasen (ePK) zeichnen sich durch eine konservierte katalytische Domäne aus und können in mehrere Gruppen eingeteilt werden: CK1 (Casein Kinase-1), CMGC (CDK, MAPK, GSK und CDK-like), TKL (*tyrosine kinase-like*), AGC (PKA, PKG, PKC), CAMK (*calmodulin-dependent kinases*), STE, TK (Tyrosinkinasen) und OPK (*other protein kinases*: Kinasen, die in keine der vorangegangenen Gruppen einzuteilen sind).²¹ Das Kinom von *Plasmodium falciparum* enthält homologe Kinasen aus vielen der oben genannten Gruppen, allerdings keine Vertreter der Gruppen TK und STE. Zusätzlich gibt es die sogenannten orphan kinases und eine neuartige Unterfamilie (FIKK), die spezifisch für Apicomplexa ist.²²⁻²⁴ Zu den Kinasen aus den zwei letztgenannten Gruppen gibt es keine entsprechenden Enzyme in Säugetieren. Dieser Umstand macht sie als Targets für die antiplasmodiale Therapie besonders interessant. Jedoch auch Kinasen, von denen entsprechende homologe Enzyme in Säugetieren existieren, weisen häufig eine genügend abweichende Sequenz auf, um selektive Inhibitoren zu identifizieren. Einige Proteinkinasen von *Plasmodium falciparum*, die bereits eingehender auf ihre Struktur und auf potentielle Inhibitoren untersucht wurden, werden im Folgenden näher betrachtet. Die PfGSK-3 ist Gegenstand des Abschnittes 2.4.

2.3.1 Pfnek-1

Die Pfnek-1 ist eine NimA-verwandte Serin/Threonin-Kinase (NimA = never-in-mitosis/-Aspergillus). Homologe dieser Kinase sind auch in Säugetieren (NEK: *NimA-related kinase*) zu finden und neben den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt.²⁵ Pfnek-1 enthält allerdings Aminosäure-Sequenzen, die sonst in keiner eukaryotischen NEK vorhanden sind. Die unterschiedlichen Sequenzen geben Anlass zur Hoffnung, *P. falciparum*-spezifische Inhibitoren dieses Enzyms zu finden. Pfnek-1 wird durch unterschiedliche Substanzen mit IC₅₀-Werten im einstelligen mikromolaren bis submikromolaren Bereich gehemmt. Dazu gehören einige Naturstoffe, die aus verschiedenen marinen Schwämmen isoliert wurden: Xestochinon (**12**) aus Xestospongia, einer Gattung von Meeresschwämmen, hemmt die Pfnek-1 mit einem IC₅₀-Wert von 1 µM selektiv bezogen auf verschiedene CDK/Cyclin-Komplexe.²⁶ Hymenialdisin (**13**) weist einen IC₅₀-Wert von 4 µM auf²⁷, zeigte aber an Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), GSK-3 und Caseinkinase-1 (CK-1) inhibitorische Aktivität im nanomolaren

Bereich.²⁸ Das synthetisch dargestellte Aminopurvalanol (**14**) ist als CDK-Inhibitor bekannt und hemmt die *Pfnek-1* mit einem IC_{50} -Wert von $0.2 \mu M$.²⁷

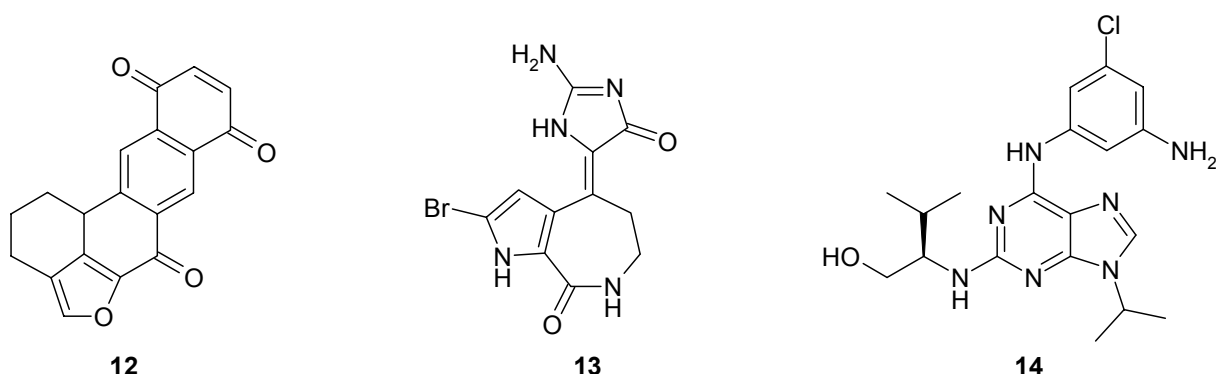


Abbildung 2-6: Inhibitoren der *Pfnek-1*

2.3.2 *PfPK7*

PfPK7 gehört zu den orphan kinases von *Plasmodium falciparum*, ein humanes homologes Enzym ist nicht vorhanden. Vermutlich ist *PfPK7* an der Zellproliferation und Entwicklung von *P. falciparum* beteiligt, denn die Inaktivierung von *PfPK7* führt zu einer verminderten asexuellen Wachstumsrate.²⁹ Merckx et al. beschrieben 2008 die Kristallstruktur von *PfPK7* und stellten einige ATP-kompetitive Inhibitoren vor, die die Proteinkinase im mikromolaren Bereich hemmten.³⁰ Darunter befinden sich unter anderem der SRC-Inhibitor PP2 und bestimmte Imidazopyridazine, die auch von Bryan und Mitarbeitern auf ihre *PfPK7*-Hemmung hin untersucht wurden. Dieser Arbeitsgruppe gelang die Synthese des Derivates **15**, das eine Hemmung von *PfPK7* im nanomolaren Bereich zeigte (IC_{50} -Wert = $0.13 nM$).³¹

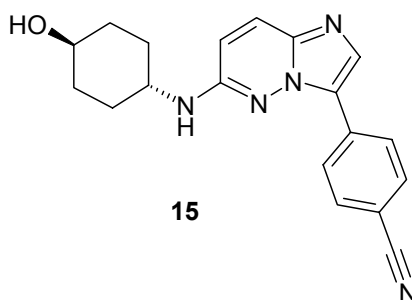


Abbildung 2-7: *PfPK7*-Inhibitor

2.3.3 Homologe Kinasen der Cyclin-abhängigen Kinasen

Cyclin-abhängige Kinasen (CDK = cyclin-dependent kinase) sind in eukaryotischen Zellen an der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt. *Plasmodium falciparum* besitzt sieben CDK-homologe Proteinkinasen: *PfPK5*, *PfPK6*, *Pfmrk*, *Pfcrk-1*, *Pfcrk-3*, *Pfcrk-4* und *Pfcrk-5*. Vermutlich spielen diese auch eine Rolle innerhalb des Zellzyklus des Malariaerregers. Von den sieben CDK-verwandten Proteinkinasen sind einige näher auf ihre Struktur und auf Inhibition durch verschiedene Substanzen untersucht worden.³²

1994 wurde die *PfPK5* als erste Kinase in dieser Gruppe beschrieben.³³ 2003 wurden von Holton et al. verschiedene Kristallstrukturen des Monomers und der Cokristallisate mit bekannten CDK-Inhibitoren vorgestellt.³⁴ Die *PfPK5* wird durch Indirubin-3'-monoxim (**16**), Staurosporin (**17**), Purvalonol A und B (**18a, b**) und Hymenialdisin (**13**) gehemmt. Allerdings zeigten diese Inhibitoren bei den parallel getesteten humanen Cyclin-abhängigen Kinasen eine stärkere inhibitorische Aktivität.^{34,35} Selektive Inhibitoren der *PfPK5*, die als Leitstrukturen zur Entwicklung antiplasmodialer Wirkstoffe fungieren könnten, sind bis jetzt nicht beschrieben worden.

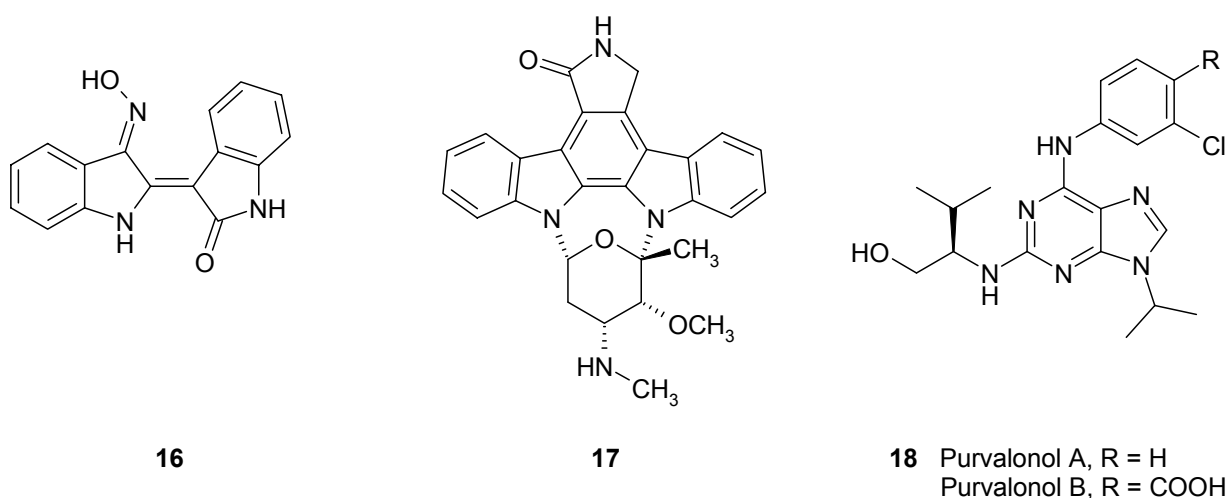


Abbildung 2-8: Bekannte Proteinkinase-Inhibitoren mit *PfPK5*-Hemmwirkung

Die *Pfmrk* wurde 1996 das erste Mal beschrieben.³⁶ Die ersten Inhibitoren stellten Xiao et al. 2001 vor. Dabei handelt es sich um 3-Phenylchinolinone, deren bester Vertreter **19** die *Pfmrk* mit einem IC_{50} -Wert von 18 μM hemmt.³⁷ Weitere Hemmstoffe sind Oxindole³⁸ wie **20** (IC_{50} = 1.4 μM) und Chalkone³⁹ wie **21** (IC_{50} = 1.3 μM). Oxindole und Chalkone hemmen *Pfmrk* selektiv gegenüber *PfPK5*, die Oxindole auch gegenüber humaner CDK1.

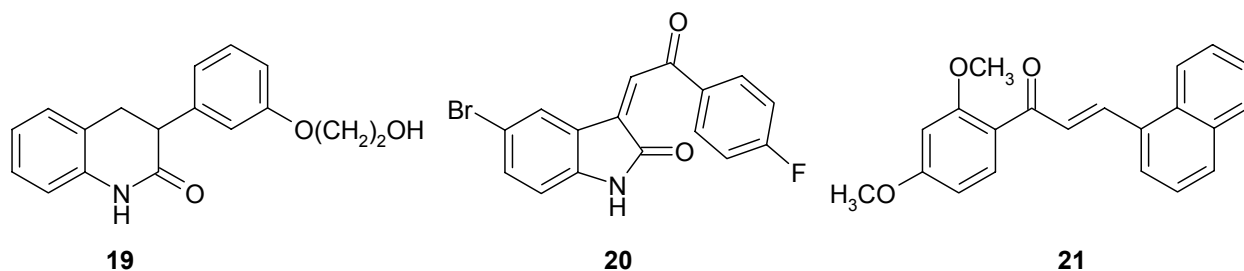


Abbildung 2-9: Pfmrk-Inhibitoren

2.4 PfGSK-3 im Vergleich zur humanen GSK-3

Droucheau et al. befassten sich mit der Charakterisierung der *Plasmodium falciparum* Glycogen Synthase Kinase-3 (PfGSK-3) und gingen dabei auch auf Unterschiede zur humanen GSK-3 (HsGSK-3) ein.⁴⁰ Diese Informationen können dabei helfen, die PfGSK-3 als potentielles Target in der Antimalariatherapie zu bewerten. In den folgenden Abschnitten soll kurz auf die humane GSK-3 eingegangen werden. Daraufhin wird die PfGSK-3 im Vergleich zur GSK-3 von Säugetieren in Bezug auf Primär- und Tertiärstruktur, Expression, Lokalisation und Verhalten gegenüber bekannten Proteinkinaseinhibitoren näher beschrieben.

2.4.1 Struktur und Regulation der GSK-3

Die Serin/Threonin-Kinase Glycogen Synthase Kinase-3 gehört wie die Cyclin-abhängigen Kinasen zu der Gruppe CMGC der eukaryotischen Proteinkinasen und ist mit diesen nah verwandt. In Säugetierzellen liegt sie in zwei Isoformen, GSK-3 α und GSK-3 β vor.²¹ Diese verfügen über den typischen Aufbau aller eukaryotischen Proteinkinasen: Der N-terminale Bereich besteht vorwiegend aus antiparallelen β -Faltblattstrukturen, der C-terminale Bereich aus α -Helices. Die beiden Domänen werden über eine kurze Aminosäuresequenz verbunden. Im Bereich dieser Hinge-Region befindet sich die katalytische Domäne.⁴¹

Im Gegensatz zu anderen verwandten Kinasen wie zum Beispiel ERK2, die zur Aktivierung eine Phosphorylierung bestimmter Tyrosin/Threoninreste benötigen, ist die GSK-3 im Grundzustand aktiv. Eine Erhöhung der Aktivität um das Doppelte wird allerdings durch die Phosphorylierung des Tyrosins Tyr216 (GSK-3 β) bzw. Tyr279 (GSK-3 α) hervorgerufen.⁴²

Die GSK-3 besitzt eine besondere Substratspezifität, da sie bevorzugt Substrate an einem Serin- oder Threoninrest phosphoryliert, die in C-terminaler Richtung im Abstand von vier Aminosäuren bereits ein Phosphoserin oder -threonin besitzen. Die Aminosäureabfolge entspricht demnach Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt. Die Substrate werden folglich zunächst von einer anderen Kinase phosphoryliert, wie zum Beispiel die Glycogen Synthase durch die Proteinkinase CK2. Das Phosphat geht mit der Oxyanion-Bindetasche (Arg96, Arg180 und Lys205 der GSK-3 β) eine Wechselwirkung ein, so dass das Substrat in der Substrat-Bindetasche einer Phosphorylierung zugänglich gemacht wird.⁴³

Die Aktivität von GSK-3 wird durch Autoinhibition reguliert. Ein Serinrest (Ser9 in GSK-3 β , Ser21 in GSK-3 α) im N-terminalen Bereich wird durch andere Kinasen phosphoryliert. Dieses Phosphoserin wird als Pseudosubstrat in der Oxyanion-Bindetasche gebunden, und der N-Terminus verschließt den Zugang zu der Substrat-Bindetasche.⁴⁴

2.4.2 Bedeutung bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen

Neben anderen regulierenden Funktionen spielt die GSK-3 insbesondere eine Rolle in der Insulinsignalkaskade und im Wnt/ β -Catenin-Signalweg.

GSK-3 phosphoryliert die Glycogen Synthase und wandelt sie dadurch in die weniger aktive Form um, so dass weniger Glycogen gebildet wird, und der Blutglucosespiegel ansteigt. Wird Insulin an seinen membranständigen Rezeptor gebunden, werden im Folgenden mehrere Enzyme aktiviert, was schließlich zur Aktivierung von Proteinkinase B führt. Durch diese wird GSK-3 an Ser9 bzw. Ser21 phosphoryliert und damit inaktiviert. Dadurch wird die Aktivität der Glycogen Synthase verstärkt und somit vermehrt Glycogen gebildet, wodurch der Blutglucosespiegel sinkt.⁴⁴

Ein Teil des intrazellulären Pools an GSK-3 liegt in einem Multiproteinkomplex mit Axin, APC-Protein und β -Catenin vor. In diesem Komplex wird β -Catenin durch GSK-3 am N-Terminus phosphoryliert, was die Voraussetzung zum Abbau dieses Proteins ist. Werden Wnt-Proteine an ihren membranständigen Rezeptor gebunden, zerfällt der Multiproteinkomplex, unphosphoryliertes β -Catenin akkumuliert, wandert in den Zellkern und interagiert dort mit Transkriptionsfaktoren, die die Expression bestimmter Gene initiieren, die mit embryonalen Entwicklungsprozessen, aber auch mit der Selbsterneuerung adulten Gewebes verknüpft sind.⁴⁵

GSK-3 wird mit der Entstehung verschiedener Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dazu gehören Diabetes mellitus, Krebs und neurodegenerative Erkrankungen wie die Parkinson-Krankheit und Morbus Alzheimer. Morbus Alzheimer zeichnet sich einerseits durch extrazelluläre Ablagerungen von β -Amyloid aus, andererseits durch intrazelluläre Einschlüsse von hyperphosphoryliertem Mikrotubuli-assoziiertem tau-Protein. GSK-3 wird sowohl mit der Entstehung des β -Amyloids als auch mit der Hyperphosphorylierung von tau-Protein in Verbindung gebracht.⁴³

2.4.3 Bekannte GSK-3-Inhibitoren

Lithium wird seit mehreren Jahrzehnten in der Behandlung bipolarer Störungen und Depressionen eingesetzt. Später wurde die GSK-3 als Target des Lithiums identifiziert. In letzter Zeit wurden weitere GSK-3-Inhibitoren entwickelt, die eine höhere Wirksamkeit und Selektivität aufweisen. Die meisten dieser Substanzen sind ATP-kompetitive Inhibitoren, die Wechselwirkungen mit der ATP-Bindetasche der GSK-3 eingehen und dadurch den physiologischen Cofaktor verdrängen. Es sind jedoch auch Substanzen beschrieben worden, die über einen nicht-ATP-kompetitiven Mechanismus verfügen.

Die Maleinimide SB-216763 (**22**) und SB-415286 (**23**) hemmen die GSK-3 selektiv mit IC_{50} -Werten von 34 nM und 78 nM. Zudem zeigten sie in humanen Leberzelllinien eine Stimulierung der Glycogensynthese und damit eine insulinähnliche Wirkung.⁴⁶

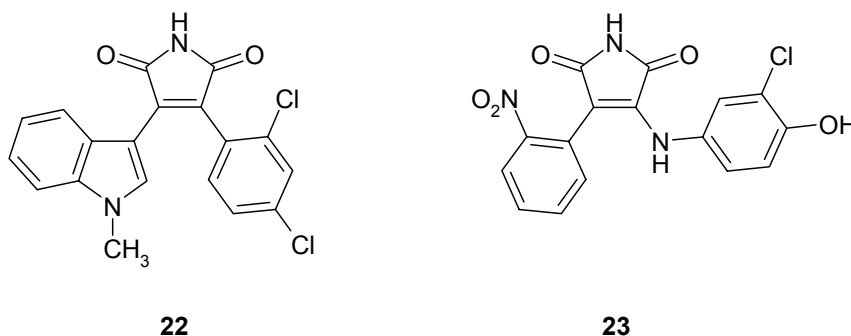


Abbildung 2-10: Maleinimide

Hymenialdisin (**13**) hemmt die GSK-3 mit einem IC_{50} -Wert von 10 nM. Im Gegensatz zu den Maleinimiden ist es jedoch weniger selektiv, da Cyclin-abhängige Kinasen und die Casein Kinase-1 ebenso im zweistelligen nanomolaren Bereich gehemmt werden.²⁸

Indirubine wurden seit langem als Bestandteil bestimmter Kräuterauszüge in der traditionellen chinesischen Medizin verwendet. Laut jüngeren Untersuchungen hemmten

sie GSK-3 und Cyclin-abhängige Kinasen im nanomolaren Bereich. Das am intensivsten untersuchte Indirubin ist das Indirubin-3'-monoxim (**16**).⁴⁷

Bei Chiron wurden Substanzen entwickelt, die GSK-3 selektiv gegenüber anderen Kinasen hemmen. Dabei handelt es sich um Pyrimidine, die über einen Ethylendiamin-Linker mit einem Aromaten verbunden sind. Die beiden Vertreter CT 99021 (**24**) und CT 20026 (**25**) gelangten bis in die präklinische Entwicklung. Sie hemmten die GSK-3 mit IC_{50} -Werten von 5 nM bzw. 4 nM und zeigten auch in ersten Versuchen an Ratten bzw. Affen eine Reduktion des Blutglucosespiegels im oralen Glucosetoleranztest (oGTT). Insbesondere CT 20026 zeichnete sich außerdem durch günstige pharmakokinetische Eigenschaften wie lange Halbwertszeit, Löslichkeit und Zellgängigkeit aus.⁴⁸

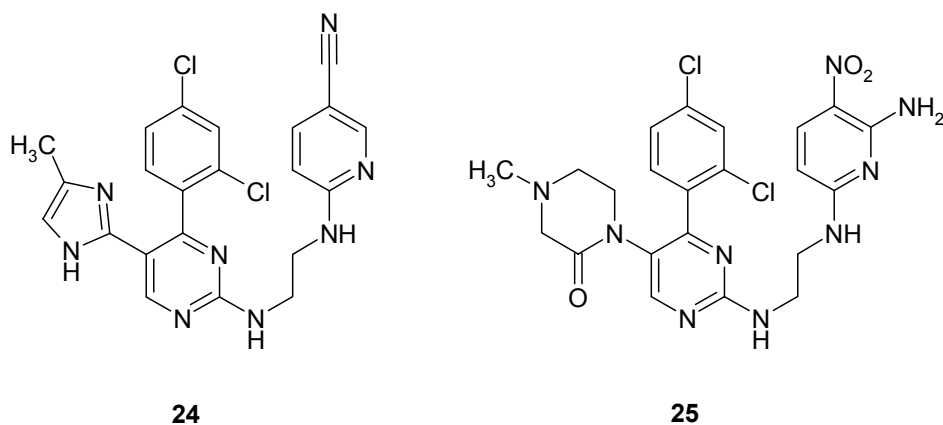


Abbildung 2-11: Chiron-Inhibitoren

Das Thiazol-Derivat AR-A014418 (**26**) der Firma AstraZeneca hemmte die GSK-3 selektiv mit einem IC_{50} -Wert von 104 nM. Außerdem wurden die Inhibition der Phosphorylierung von tau-Protein und eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen. AR-A014418 stellt somit einen geeigneten Ausgangspunkt für die Wirkstoffentwicklung im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen dar.⁴⁹

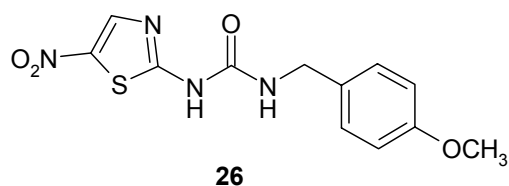


Abbildung 2-12: AR-A014418

Paullone wie das Alsterpaullon (**27**) sind Inhibitoren der GSK-3 β und Cyclin-abhängiger Kinasen und hemmen die Phosphorylierung von tau-Protein.⁵⁰ Das Paullonderivat 1-Azakenpaullon (**28**) hemmt die GSK-3 selektiv mit einem IC₅₀-Wert von 18 nM.⁵¹ Durch Weiterentwicklung entstand das 9-Cyano-1-azapaullon (**29**, Cazpaullon), welches eine verbesserte inhibitorische Aktivität (IC₅₀: 8 nM) bei ähnlichem Selektivitätsprofil aufwies. Für die 1-Azapaullone wurde außerdem eine Protektion und Proliferationsstimulation pankreatischer β -Zellen nachgewiesen.⁵²

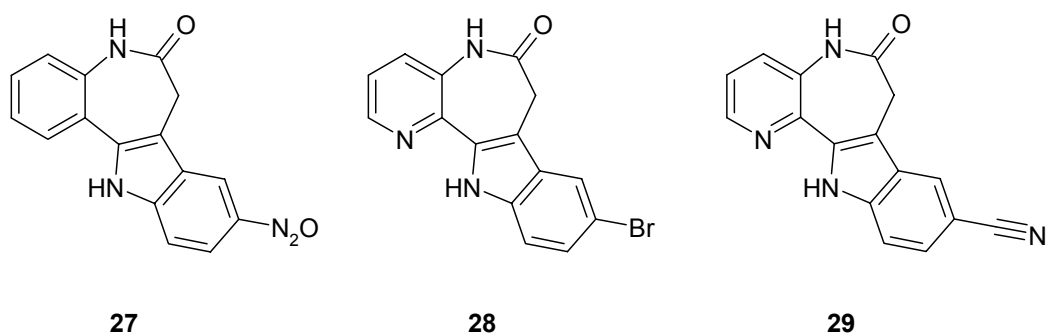


Abbildung 2-13: Paullone

Die ersten nicht-ATP-kompetitiven Inhibitoren wurden von Martinez et al. beschrieben. Dabei handelt es sich um Thiadiazolidinone wie Verbindung TDZD-8 (**30**). Diese Verbindung ist ein selektiver GSK-3-Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert von 2 μ M.⁵³

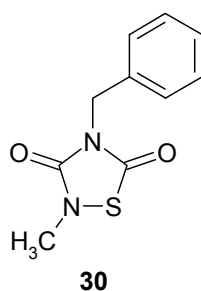


Abbildung 2-14: TDZD-8

2.4.4 Aminosäuresequenz und Tertiärstruktur der PfGSK-3

Während der Sequenzierung des Genoms von *Plasmodium falciparum* wurde eine DNA-Sequenz identifiziert, die für eine GSK-3-homologe Kinase codiert. Diese *Plasmodium falciparum* Glycogen Synthase Kinase-3 ist der humanen GSK-3 β ähnlicher als der GSK-3 α . Die Aminosäuresequenz ist zu 58.2% identisch mit GSK-3 β und zu 56.1% mit GSK-

3α. Diese Ähnlichkeit wird zusätzlich durch die positive Reaktion von polyklonalem GSK-3β-Antikörper mit *PfGSK-3* verdeutlicht.

Auch zu GSK-3-Homologen aus anderen Spezies hat *PfGSK-3* eine hohe Ähnlichkeit, insbesondere zur GSK-3 aus *Toxoplasma gondii*, das wie *Plasmodium falciparum* zu den Apicomplexa gehört. Auffallend ist außerdem ein verlängerter N-Terminus, der sonst nur bei *Hydra vulgaris*, dem Gemeinen Süßwasserpolyphen zu beobachten ist.

Eine Röntgenkristallstruktur von *PfGSK-3* ist noch nicht verfügbar, jedoch wurde von Droucheau et al. ein Homologiemodell vorgestellt, welches aus den Informationen der Aminosäuresequenz von *PfGSK-3* und einer veröffentlichten Struktur von humaner GSK-3β⁴² berechnet wurde. Aufgrund der ähnlichen Aminosäuresequenz ist es nicht überraschend, dass die Tertiärstrukturen von *PfGSK-3* und GSK-3β fast identisch sind. (siehe Abbildung 2-15).

Betrachtet man die wichtigen Domänen von *PfGSK-3* in Bezug auf ihre Funktion als Kinase, fällt auch hier ein hohes Maß an konservierten Sequenzen im Vergleich zu GSK-3β auf. Dazu gehören die katalytische Domäne mit Lys108, Glu120, Asp206 und Asp225 (in GSK-3β: Lys85, Glu97, Asp181 und Asp200) und der Tyrosinrest, der durch Phosphorylierung zur Aktivitätssteigerung der Kinaseaktivität führt (Tyr241 in *PfGSK-3*, Tyr216 in GSK-3β). Zudem scheint *PfGSK-3* wie humane GSK-3 über die Präferenz für präphosphorylierte Substrate zu verfügen, da mit Arg119, Arg205 und Lys230 auch die Aminosäuren konserviert sind, die die Oxyanion-Bindetasche ausbilden.

Die inhibitorische Domäne (Ser9 in GSK-3β) ist nicht konserviert. Demzufolge wird die Aktivität von *PfGSK-3* offensichtlich über andere Regulationsmechanismen gesteuert.

Bei genauerer Betrachtung der ATP-Bindetasche fallen weitere Unterschiede ins Gewicht. Die Aminosäuren 133 bis 139 in GSK-3β bilden die Hinge-Region aus. ATP und ATP-kompetitive Inhibitoren bilden häufig Wasserstoffbrückenbindungen zu dieser Region aus, insbesondere zum Val135. Genau diese Aminosäure ist in der *PfGSK-3* nicht konserviert, an seiner Stelle steht das Ile160. Ein anderer wichtiger Unterschied sind die verschiedenen *gatekeeper*. Anstelle des Leu132 in GSK-3β befindet sich in *PfGSK-3* das Met157. Die Größe des *gatekeepers* bestimmt über den Zugang zur hydrophoben Tasche und damit unter anderem über die Selektivität eines Inhibitors.⁵⁴

Ein weiterer wichtiger Unterschied zur GSK-3β ist, dass *PfGSK-3* keine anhaltende Bindung zu Axin eingeht und folglich auch nicht durch Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Axin gereinigt werden kann, welches eine übliche Reinigungsmethode für GSK-3 darstellt.⁵⁵

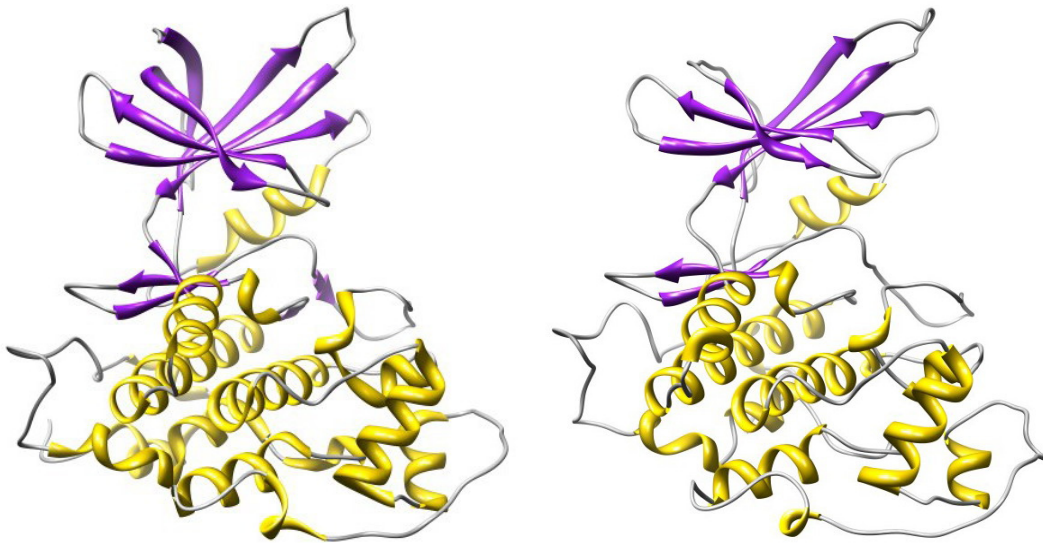


Abbildung 2-15: Vergleich der Tertiärstrukturen von GSK-3 β (links, PDB: 1q3w⁵⁶) und *Pf*GSK-3 (rechts, erstellt mit SWISS-Model); Bilder erstellt mit Chimera

2.4.5 Expression und Lokalisation im Erythrozyten

Mit Hilfe dreier verschiedener Antikörper wurde die Expression von GSK-3 in roten Blutkörperchen mittels Western Blot untersucht. In nicht infizierten Erythrozyten reagierten weder die beiden monoklonalen Antikörper gegen GSK-3 α/β bzw. GSK-3 β noch der polyklonale Antikörper gegen eine C-terminale Sequenz von GSK-3 β , der auch mit *Pf*GSK-3 reagiert. Dementsprechend befindet sich in nicht infizierten Erythrozyten weder humane noch plasmodiale GSK-3. In von *Plasmodium falciparum* befallenen Erythrozyten wurde GSK-3 nachgewiesen, die nur mit dem polyklonalen Antikörper reagiert und außerdem nicht an Axin bindet, es handelt sich also wahrscheinlich um *Pf*GSK-3. Die Konzentration an *Pf*GSK-3 scheint im frühen Trophozoiten-Stadium am höchsten zu sein. Die Lokalisation von *Pf*GSK-3 im infizierten Erythrozyten wurde durch Immunofluoreszenz dargestellt. Dazu wurden aus Plasmodien-Kulturen, die mit Sorbitol synchronisiert worden waren⁵⁷, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion Proben entnommen, mit dem polyklonalen GSK-3 β -Antikörper behandelt und die *Pf*GSK-3 durch Immunofluoreszenz sichtbar gemacht. Innerhalb des Parasiten zeigte sich nur eine geringe Reaktion. Vorwiegend wurde die Immunofluoreszenz an Vesikel-ähnlichen Strukturen im

Cytoplasma des befallenen Erythrozyten beobachtet. Gleichzeitige Zugabe eines Antikörpers, der gegen *Pf332*, ein plasmodiales Protein, gerichtet ist, zeigte die gleiche Lokalisation dieses Proteins wie *PfGSK-3*. Von diesem Protein ist bekannt, dass es in den Maurer'schen Spalten, bzw. Maurer's *clefts*, lokalisiert ist. Dabei handelt es sich um Strukturen, die mit dem Proteintransport in mit *P. falciparum* befallenen Erythrozyten assoziiert sind.^{58,59} Diese Colokalisation spricht dafür, dass *PfGSK-3* aus dem Parasiten hinaus- und zu den Maurer'schen Spalten hintransportiert wird. Verschiedene Proteine, die mit den Maurer'schen Spalten interagieren, wie zum Beispiel *Pf332*, verfügen über die Sequenz Ser-X-X-X-Ser und bieten folglich die Möglichkeit zur Präphosphorylierung. Sie stellen somit potentielle Substrate der *PfGSK-3* dar.⁴⁰

2.4.6 Mögliche Funktionen von *PfGSK-3*

Die humane GSK-3 übernimmt im menschlichen Körper vielfältige Aufgaben. Welche Funktionen *PfGSK-3* im Malariaerreger *Plasmodium falciparum* hat, ist noch nicht bekannt. Da das Enzym sich zum großen Teil auch im Cytoplasma des befallenen Erythrozyten befindet, ist eine Beteiligung von *PfGSK-3* sowohl an regulierenden Prozessen im Erythrozyten als auch im Parasiten selbst denkbar. Im Parasiten könnten die Regulation des Stoffwechsels, der Zellzyklus oder die Ausdifferenzierung im Laufe der Entwicklung vom Ringstadium zum Schizonten beeinflusst werden. Im Erythrozyten könnten durch *PfGSK-3* Veränderungen im Metabolismus und im Cytoskelett hervorgerufen sowie der Membrantransport bewerkstelligt werden.

Eine von Droucheau et al. favorisierte Hypothese zur möglichen Funktion von *PfGSK-3* stellt jedoch eine Beteiligung in der Regulation des zirkadianen Rhythmus in den Mittelpunkt: In *Plasmodium falciparum* unterliegen die Übergänge von einem Stadium ins nächste einschließlich der Ruption der Erythrozyten und anschließendem Befall neuer Erythrozyten einem beeindruckend starken Synchronismus.⁴⁰

Young und Mitarbeiter zeigten, dass die homologe Kinase der GSK-3 in der Fruchtfliege an der Regulierung des zirkadianen Rhythmus beteiligt ist. Dabei phosphoryliert diese Kinase das Protein TIMELESS, welches mit einem anderen Protein (PERIOD) ein Heterodimer bildet. Dieses Heterodimer fungiert als Regulator der zirkadianen Uhr und gelangt durch die Phosphorylierung leichter in den Zellkern. PERIOD wird zusätzlich mittels Phosphorylierung durch DOUBLE-TIME, einer Homologen der Casein Kinase-1 ϵ , im Cytoplasma akkumuliert.⁶⁰

Mit *PfCK-1* wurde im Kinom von *Plasmodium falciparum* eine homologe Kinase zu DOUBLE-TIME gefunden.⁶¹ Die Anwesenheit der beiden Kinasen *PfGSK-3* und *PfCK-1* ist ein Hinweis dafür, dass der zirkadiane Rhythmus des Malariaerregers durch diese reguliert werden könnte.

2.4.7 Kinaseaktivität und Inhibition der *PfGSK-3*

Zur Untersuchung der Hemmung von *PfGSK-3* durch potentielle Inhibitoren wurde rekombinantes Enzym verwendet. Zu dessen Produktion wurde die cDNA mit Hilfe des pBAD/ThioTOPO-Vektors in *E.coli*-Zellen eingebracht, die anschließend zur Expression von (His)₆-tagged *PfGSK-3* angeregt wurden. Durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Cobalt erfolgte die Reinigung des rekombinanten Proteins. Die Assays zur Bestimmung der Kinaseaktivität wurden mit dem Peptid GS-1, einem spezifischen GSK-3-Substrat, und [γ -³²P] ATP durchgeführt. Das inkorporierte radioaktive Phosphat steht in direkter Beziehung zur Kinaseaktivität. Kinaseaktivitäten wurden in den ersten Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie beobachtet.⁴⁰

Neben GS-1 werden auch Glycogen Synthase, tau-Protein und Axin durch rekombinante *PfGSK-3* phosphoryliert.⁴⁰

Einige bekannte GSK-3-Inhibitoren wurden auf ihre Wirkung auf die Kinaseaktivität von rekombinanter *PfGSK-3* untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen an Inhibitor eingesetzt. Die IC₅₀-Werte wurden aus den Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmt und mit den IC₅₀-Werten von GSK-3 β aus Säugetierzellen verglichen (Tabelle 2-1).⁴⁰

Staurosporin ist ein unselektiver Kinaseinhibitor, Flavopiridol ein relativ unspezifischer CDK/GSK-3-Inhibitor, ebenso wie Indirubin-3'-monoxim und Hymenialdisin (siehe 2.4.3). Diese vier Substanzen hemmten in den Testungen *PfGSK-3* und GSK-3 β in derselben Größenordnung, sie zeigten keine Selektivität für eines der beiden Enzyme.

Tabelle 2-1: Hemmung rekombinanter *Pf*GSK-3 und Säugetier-GSK-3 β durch bekannte GSK-3-Inhibitoren⁴⁰

Compound	<i>Pf</i>GSK-3 IC ₅₀ [μ M]	GSK-3β IC ₅₀ [μ M]
Staurosporin	0.01	0.015
Flavopiridol	2.3	0.45
Indirubin-3'-monoxim	0.065	0.022
Hymenialdisin	0.023	0.01
Paullon	18.0	0.62
Kenpaullon	8.0	0.023
Gwennpaullon	1.5	0.04
Alsterpaullon	0.32	0.004

Die getesteten Paullon-Derivate zeigten eine mäßige bis gute Hemmwirkung der *Pf*GSK-3, allerdings war diese inhibitorische Aktivität 100-300 mal geringer als an GSK-3 β . Die Paullone verfügen also über eine gewisse Selektivität für GSK-3 β gegenüber *Pf*GSK-3. Die Unterschiede in der ATP-Bindetasche sind dementsprechend ausreichend, so dass die Darstellung *Pf*GSK-3-selektiver Inhibitoren möglich sein sollte.⁴⁰

3 RET

3.1 Aufbau und Funktion

Das *RET*-Protoonkogen wurde 1985 durch Takahashi et al. während der Transfektion von NIH3T3 Zellen mit humaner Lymphom-DNA entdeckt und dementsprechend benannt (*RET* = *rearranged during transfection*).⁶² Dieses Gen codiert für eine membranständige Rezeptortyrosinkinase, die hauptsächlich im zentralen und peripheren Nervensystem und im Urogenitaltrakt in der Entwicklungsphase exprimiert wird.^{63,64} Die *RET*-Tyrosinkinase ist essentiell für die Entwicklung des enterischen Nervensystems und der Niere sowie für die Spermatogenese.^{65,66} Der extrazelluläre Teil enthält Cadherin-ähnliche Bereiche mit benachbarten Ca^{2+} -Bindestellen. Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige Adhäsionsproteine, die bei der Zelladhäsion wichtig sind und hier eine große Rolle bei der Bindung des Liganden spielen.⁶⁷ Des Weiteren befindet sich im extrazellulären Teil eine Cystein-reiche Region, die wichtig für die Ausbildung der Tertiärstruktur und die Dimerisierung des Rezeptors ist.^{68,69} An die Transmembrandomäne schließen sich auf der cytosolischen Seite die Juxtamembrandomäne und die zwei Tyrosinkinasedomänen an, die durch eine Sequenz von 27 Aminosäuren getrennt sind.^{69,70} Die Kinase kann in drei Isoformen vorliegen, die sich in der Länge des C-Terminus unterscheiden: RET51, RET43 und RET9 entstehen durch unterschiedliches Splicing.⁶⁹

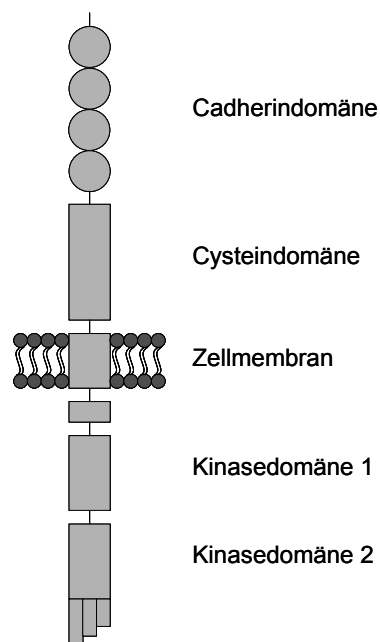


Abbildung 3-1: RET-Rezeptortyrosinkinase (modifiziert nach de Groot et al.⁷¹)

RET wird durch einen Komplex aus einem Liganden und einem Co-Rezeptor aktiviert. Als Ligand fungiert eines der vier Mitglieder der GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*)-Ligandenfamilie: GDNF, Neurturin, Persephin und Artemin. Die Liganden binden spezifisch an die Co-Rezeptoren GFR α 1-4.⁶⁹ Wird dieser Komplex an der Cadherin-ähnlichen Domäne gebunden, folgt die Dimerisierung zweier RET-Proteine. In Abhängigkeit davon, welcher Komplex an welches Isomer (meist RET9 oder RET51) gebunden hat, erfolgt die anschließende Autophosphorylierung von verschiedenen Tyrosinresten in der intrazellulären Kinasedomäne. Dieser Vorgang steht am Anfang diverser Signaltransduktionskaskaden, die Überleben, Differenzierung, Proliferation, Migration und Chemotaxis regulieren und durch weitere Proteinkinasen vermittelt werden.⁷¹

3.2 RET-assoziierte Erkrankungen

Mutationen im *RET*-Protoonkogen können entweder einen Funktionsverlust oder eine Überaktivierung der RET-Tyrosinkinase bewirken und stehen im Zusammenhang mit bestimmten humanen Erkrankungen.

Ein Funktionsverlust führt zu „Morbus Hirschsprung“, gekennzeichnet durch nicht vorhandene enterische Ganglien auf einer unterschiedlichen Länge des Dickdarms. Die Folge ist eine Einengung des entsprechenden Segmentes, es kommt zur Obstipation und daraufhin zum sogenannten Megacolon.

Andere Mutationen des *RET*-Gens verursachen die Bildung von konstitutiv aktivierter RET, die mit der Entstehung bestimmter endokriner Tumore, insbesondere von Schilddrüsenkarzinomen, in Zusammenhang gebracht wird.

Somatische Chromosomen-Translokationen führen zu chimären *RET/PTC*-Onkogenen, die für konstitutiv aktivierte RET codieren. Diese chimären Onkogene wurden in 5-30% der sporadisch auftretenden und in 60-70% der durch Radioaktivität induzierten papillären Schilddrüsenkarzinome (PTC = *papillary thyroid carcinoma*) gefunden, die aus den follikulären Schilddrüsenzellen hervorgehen.⁷²

Punktmutationen des *RET*-Protoonkogens in der Keimbahn führen dagegen zur multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN2), welche MEN2A, MEN2B und das familiäre medulläre Thyroid-Karzinom (FMTC) umfasst.⁷³⁻⁷⁵ Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Ort der Mutation auf dem *RET*-Protoonkogen und den drei verschiedenen Formen. Mutationen im extrazellulären Bereich, die häufig den Austausch von Cystein-Resten

betreffen, sind die Ursache für MEN2A und FMTC. Dadurch fällt ein Partner einer intramolekularen Disulfidbrücke weg, und der verbleibende Cysteinrest kann eine intermolekulare Disulfidbrücke zu einem zweiten RET-Protein ausbilden, so dass es zur Dimerisierung und folglich zur konstitutiven Aktivierung der Kinase kommt.⁷⁶

Bei FMTC ist das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC = *medullary thyroid carcinoma*) das einzige Symptom. Bei MTC handelt es sich um einen Tumor, der aus den Calcitonin-produzierenden C-Zellen der Schilddrüse hervorgeht. Bei MEN2A treten häufig auch ein Phäochromozytom und eine Hyperplasie der Nebenschilddrüse auf.

Mutationen innerhalb der Tyrosinkinasedomänen im intrazellulären Bereich können zu MEN2B führen. Patienten mit MEN2B haben ein komplexeres Krankheitsbild, gekennzeichnet durch MTC, Phäochromozytom, Neurinome der Schleimhäute und Ganglien und einen marfanoiden Habitus.

Zur Zeit stellt die (teilweise) Entfernung der Schilddrüse die einzige Therapiemöglichkeit dar.⁷⁷ Jedoch wird die Hemmung der konstitutiv aktivierten RET-Tyrosinkinase seit einiger Zeit als weitere Option diskutiert.

3.3 Niedermolekulare RET-Inhibitoren

Tatsächlich sind in letzter Zeit einige niedermolekulare Substanzen (*small molecules*) beschrieben worden, die sich durch eine Hemmung der RET-Kinaseaktivität auszeichnen. Die meisten dieser Substanzen sind schon als Kinase-Inhibitoren bekannt. Dazu gehören die Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine PP1⁷⁸ (**31a**) und PP2⁷⁹ (**31b**), die ursprünglich als SRC-Inhibitoren entwickelt wurden.⁸⁰

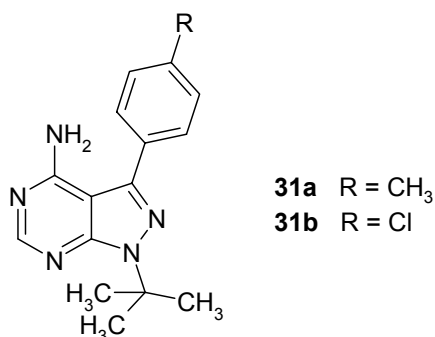


Abbildung 3-2: Pyrazolopyrimidine PP1 und PP2

Eine größere Gruppe stellen die Indolin-2-one mit RPI-1⁸¹ (**32**) und den VEGF-Rezeptor-Hemmstoffen Semaxanib (**33**) (SU5416)⁸² und Sunitinib (**34**) (SU11248, Sutent[®], Pfizer)⁸³ dar. Von diesen ist RPI-1 der einzige Vertreter, der gezielt zur Hemmung der RET-vermittelten Aktivität entwickelt wurde. Es wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen weiterentwickelt und abgewandelt.^{84,85}

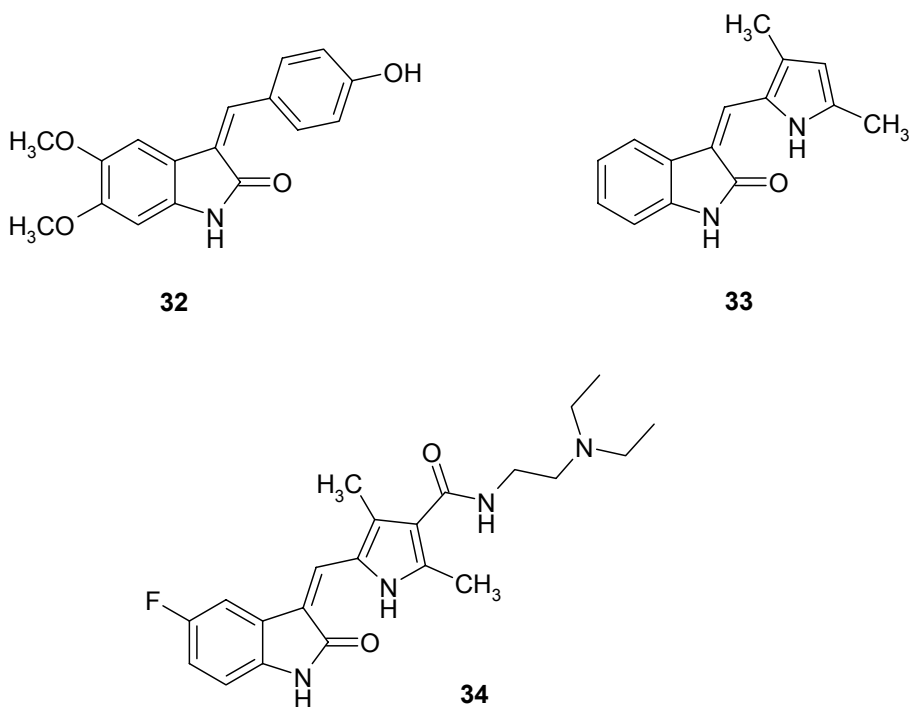


Abbildung 3-3: Indolin-2-one mit RET-inhibitorischer Wirkung

Des Weiteren zeigen auch die bekannten Kinase-Inhibitoren Vandetanib (**35**) (ZD6474, AstraZeneca)⁸⁶, Sorafenib (**36**) (Nexavar[®], Bayer)⁸⁷ und Imatinib (**37**) (Glivec[®], Novartis)⁸⁸ RET-inhibitorische Aktivität, sowie die Staurosporin-Analoga CEP-701 (**38a**) und CEP-751⁸⁹ (**38b**).

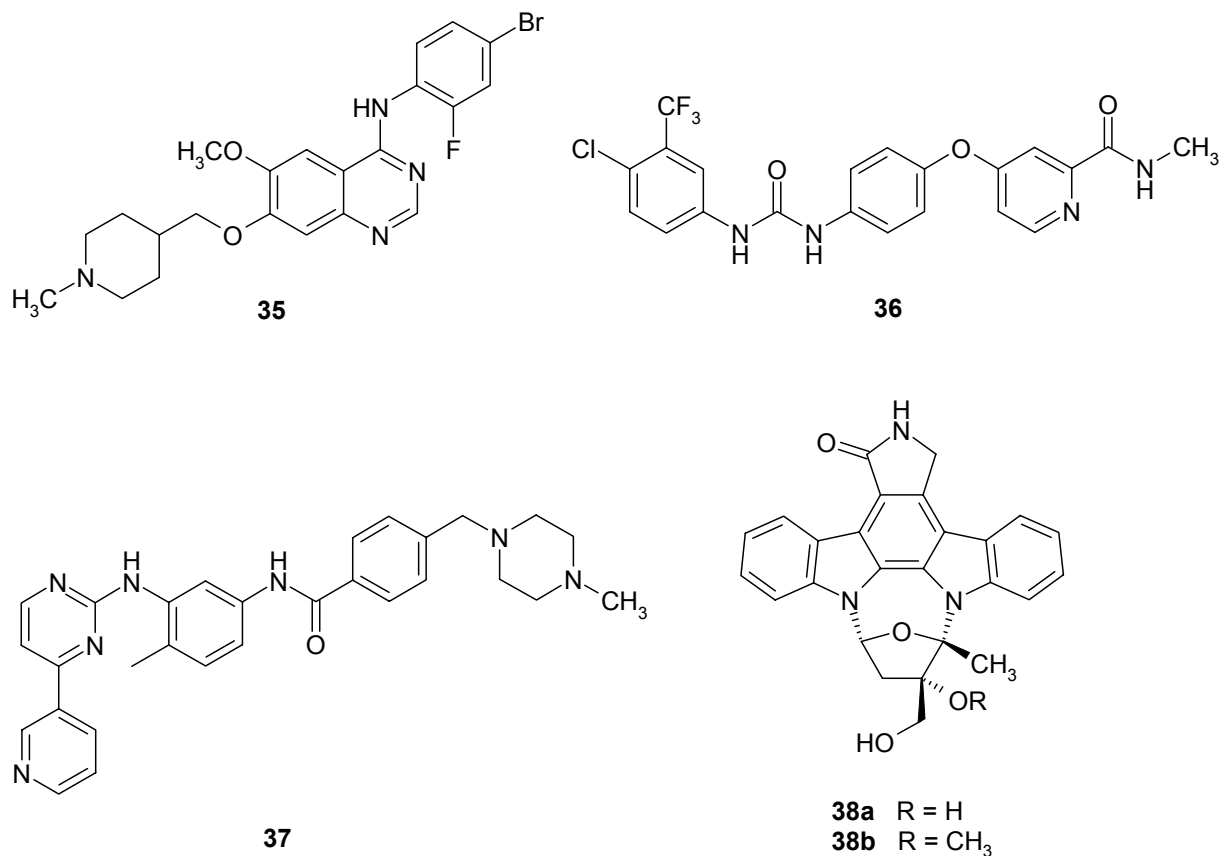


Abbildung 3-4: Bekannte Kinase-Hemmstoffe mit inhibitorischer Aktivität an RET

Durch ein Screening und nachfolgende Weiterentwicklung konnten 4-Anilinochinoline mit einem bestimmten Substitutionsmuster (**39**) als Substanzen dargestellt werden, die die RET-Kinaseaktivität im nanomolaren Bereich hemmten.⁹⁰

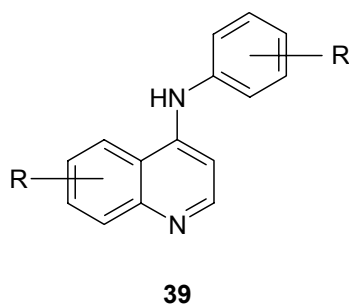
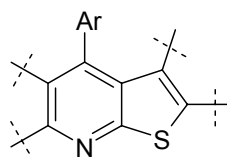


Abbildung 3-5: Grundstruktur RET-inhibitorischer 4-Aminochinoline

4 Ziel der Arbeit

In einem Hochdurchsatz-Screening wurden in den Laboratorien von Laurent Meijer (Station Biologique de Roscoff, Frankreich) 10480 Substanzen in einer Übersichtstestung auf ihre inhibitorische Aktivität an *Pf*GSK-3 untersucht. Dazu wurde bei einer Konzentration von 10 μM der jeweiligen Testverbindung und einer ATP-Konzentration von 15 μM die Restaktivität des Enzyms getestet. 18 Substanzen zeigten eine inhibitorische Aktivität an *Pf*GSK-3 und wurden zusätzlich an nativer Säugetier-GSK-3 getestet. Einige von diesen zeichneten sich durch eine gewisse Selektivität für *Pf*GSK-3 aus. Auffallend war, dass fünf dieser Substanzen das Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundgerüst **40** aufwiesen.



40

Abbildung 4-1: Grundgerüst der Thieno[2,3-*b*]pyridine

Thieno[2,3-*b*]pyridine sind in der Literatur vielfach als biologisch aktive Substanzen beschrieben worden. Unter anderem wurde eine Hemmung der bakteriellen Histidinkinase⁹¹ und der I κ B-Kinase- β ⁹² durch die Verbindungen nachgewiesen.

In einem zweiten Testzyklus wurden dann 427 verschieden substituierte Thieno[2,3-*b*]pyridine getestet. Für einige wurde eine eindeutige inhibitorische Aktivität an *Pf*GSK-3 beobachtet. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Die einen zeigten ungefähr die gleiche Aktivität an den beiden Kinasen *Pf*GSK-3 und GSK-3 aus Säugerzellen. Die anderen zeigten eine eindeutige Selektivität für *Pf*GSK-3. Der potenteste Vertreter der zweiten Gruppe war das 3,6-Diamino-2-(4-chlorbenzoyl)-4-(2-iodphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**41**), welches in diesen ersten Testungen einen IC₅₀-wert von 0.43 μM an *Pf*GSK-3 zeigte.

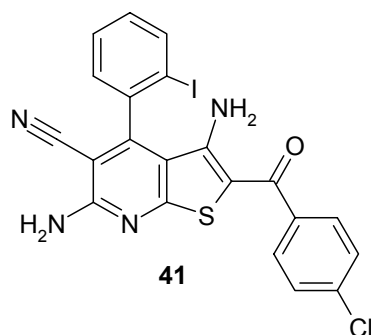


Abbildung 4-2: Hit-Struktur **41** aus dem zweiten Testzyklus

Die Hit-Struktur **41** wurde als Ausgangspunkt dieser Arbeit gesetzt. Ziel war es, durch Modifikationen an unterschiedlichen Stellen des Grundgerüsts potentielle Inhibitoren der *Pf*GSK-3 herzustellen. Diese sollten dann im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Laurent Meijer auf inhibitorische Aktivität an *Pf*GSK-3 und Säuger-GSK-3 getestet werden. Auf diese Weise sollten potente und selektive Inhibitoren der *Pf*GSK-3 identifiziert und mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden.

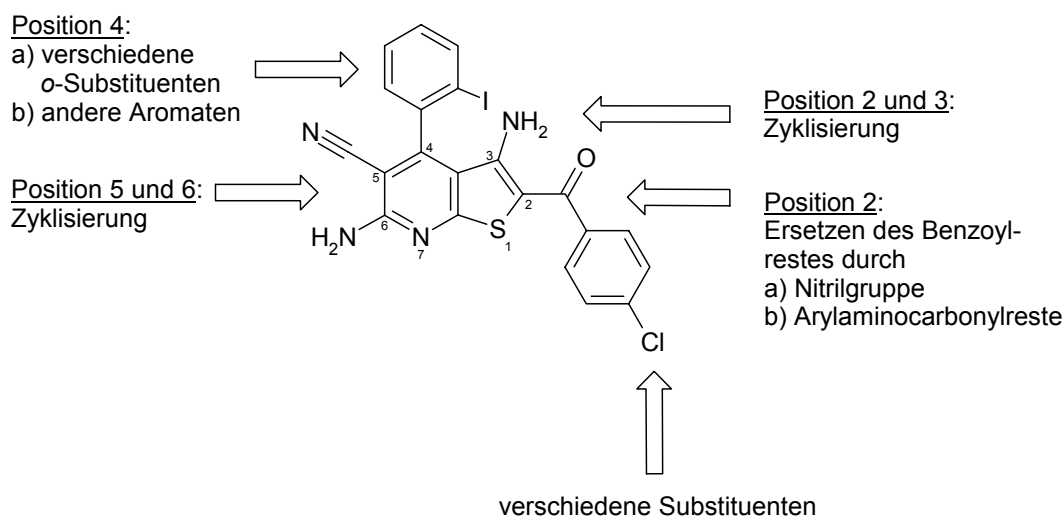


Abbildung 4-3: Geplante Modifikationen der Hit-Struktur **41**

In para-Stellung des Benzoylrestes sollte der Chlorsubstituent durch andere Reste ersetzt werden. Außerdem war geplant, den gesamten Benzoylrest an Position 2 durch andere Reste, beispielsweise durch eine Nitrilgruppe oder einen Arylaminocarbonylrest, auszutauschen. Am Aromaten in Position 4 sollten verschiedene ortho-Substituenten

eingeführt oder der Phenylrest komplett durch einen anderen aromatischen Rest ersetzt werden. Des Weiteren sollte auf der Pyridin-Seite des Moleküls statt der 5-Cyan- und der 6-Aminogruppe ein Carbozyklus wie z. B. Cyclohexen anelliert werden. Auch auf der Seite des Thiophens war die Erweiterung des anellierten Systems durch eine Zyklisierung denkbar. Abbildung 4-4 zeigt eine Übersicht der in diesem Zusammenhang wichtigsten geplanten Substanzgruppen.

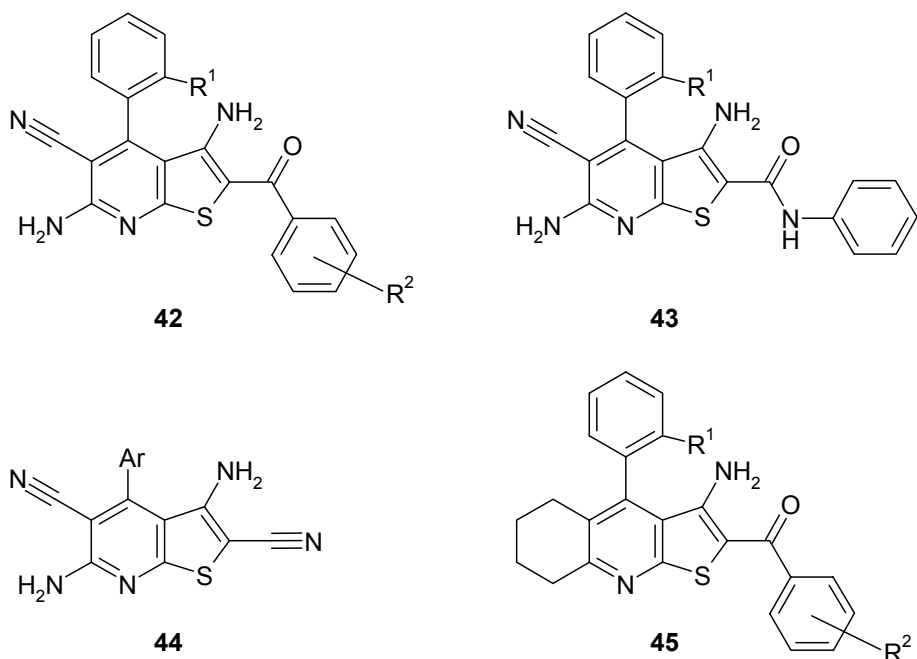


Abbildung 4-4: Geplante Substanzgruppen aus der Reihe der Thieno[2,3-*b*]pyridine

Als Substanzen mit ähnlichem Grundgerüst sollten Derivate der allgemeinen Struktur **46** synthetisiert werden.

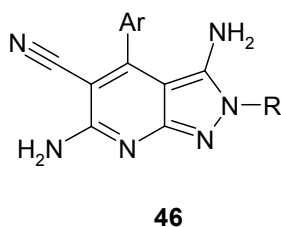
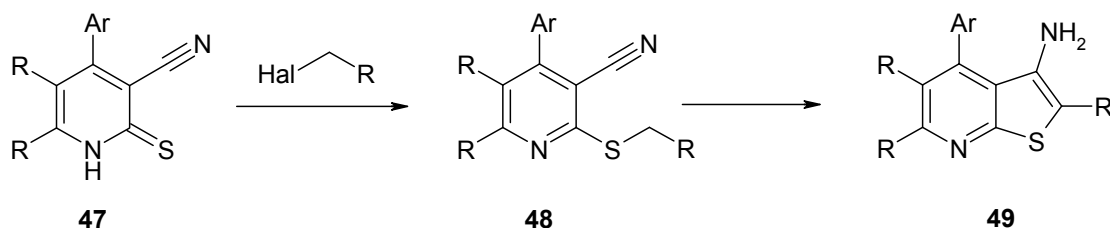


Abbildung 4-5: Angestrebte Pyrazolo[3,4-*b*]pyridine

Die Thienopyridine können in einer zweistufigen Reaktion hergestellt werden:



Schema 4-1: Allgemeine Synthese der Thienopyridine

Die als Zwischenstufe auftretenden 2-Alkylsulfanylpseudopyridin-3-carbonitrile **48** sind wie die Thienopyridine als Substanzen mit biologischer Wirkung beschrieben worden. So hemmten sie zum Beispiel die Replikation von Prionen⁹³, zeigten modulierende Eigenschaften am Adenosin-A₁-Rezeptor⁹⁴ und wiesen eine antiandrogene Wirkung auf.⁹⁵

In den Laboratorien von Luca Mologni (Monza, Italien) zeigten bestimmte 2-Alkylsulfanyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-3-carbonitrile eine inhibitorische Wirkung an der *rearranged during transfection* Rezeptortyrosinkinase (RET). Die Verbindung **50** hemmte die RET-Kinase mit einem IC₅₀-Wert von 4.5 µM.

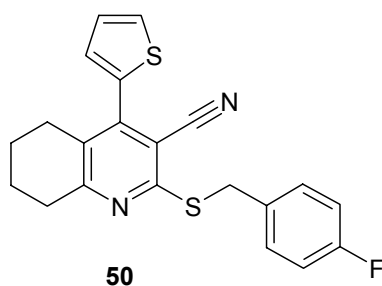


Abbildung 4-6: RET-Inhibitor **50**

Aus diesem Grund sollten auch Derivate der bei der Synthese der Thieno[2,3-*b*]pyridine **49** erhaltenen Zwischenstufe **48** isoliert und modifiziert werden, um sie als Testsubstanzen für Untersuchungen zur Entwicklung von RET-Inhibitoren zur Verfügung zu stellen.

Geplante Strukturen waren in diesem Zusammenhang von Substanz **50** abgeleitete 5,6,7,8-Tetrahydrochinolinverbindungen mit Alkylsulfanylresten in Position 2 (**51**) und ähnliche Verbindungen mit einer eingeschobenen Carbonylgruppe (**52**).

Denkbar war auch die Anellierung eines Piperidinringes anstelle des Cyclohexens unter Bildung eines 5,6,7,8-Tetrahydronaphthyridin-Grundgerüsts (**53**).

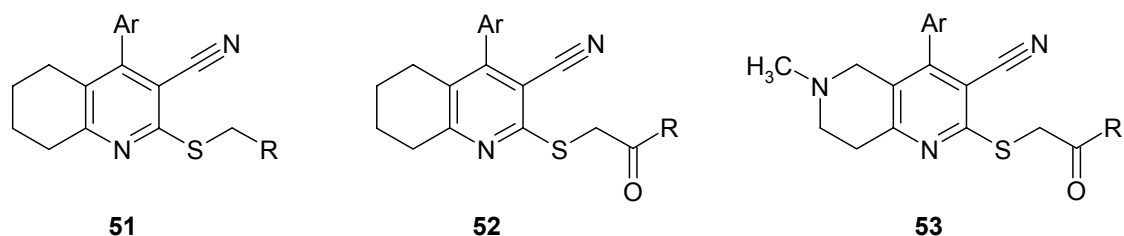


Abbildung 4-7: Geplante 5,6,7,8-Tetrahydrochinolin-/naphthyridinverbindungen

Außerdem sollten analoge Verbindungen hergestellt werden, die anstelle des anellierten zyklischen Systems an Position 2 und 3 des Pyridinringes eine Nitril- und eine Aminogruppe tragen (**54** und **55**).

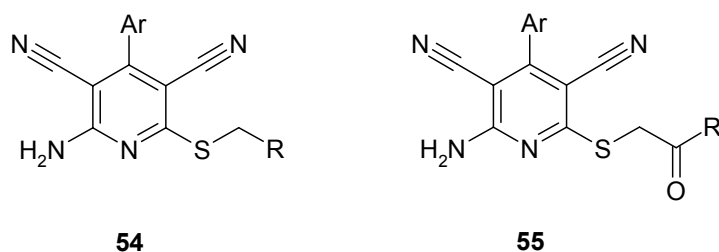


Abbildung 4-8: Angestrebte Pyridinverbindungen

5 Synthesen

5.1 Synthese der Thioxopyridine, Thioxochinoline und Thioxonaphthyridine

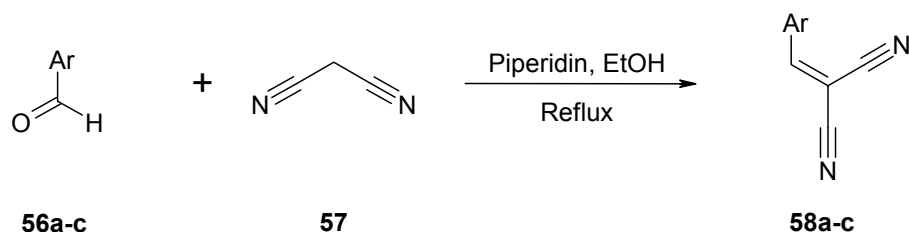
Die Thioxopyridine **62**, Thioxo-5,6,7,8-tetrahydrochinoline **72** und Thioxo-5,6,7,8-tetrahydro[1,6]naphthyridine **73** stellen die Ausgangsverbindungen zur Synthese der geplanten Thieno[2,3-*b*]pyridine und der offenkettigen Verbindungen **51**, **52**, **53**, **54** und **55** dar. In diesem Abschnitt werden die Syntheseschritte dieser Vorstufen beschrieben. Die Edukte **72** und **73** werden vereinfacht als Thioxochinoline und Thioxonaphthyridine bezeichnet.

5.1.1 Synthese der Thioxopyridine

Die Thioxopyridine **62** wurden auf zwei unterschiedlichen Synthesewegen dargestellt, die in den folgenden Abschnitten beschrieben sind.

5.1.1.1 Einführung des Schwefels durch Thiophenol

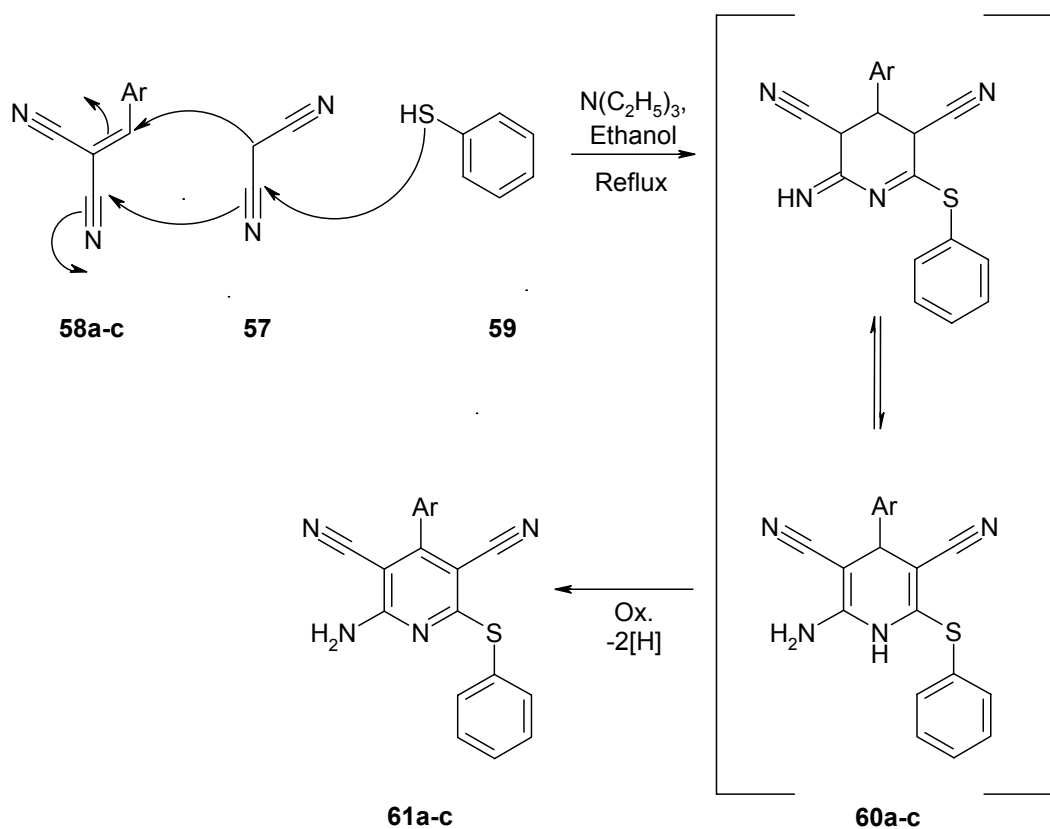
Bei diesem Syntheseweg nach Chang et al. wurden zunächst die Arylidenmalonsäuredinitrile **58** durch eine Knoevenagel-Reaktion eines entsprechend substituierten Benzaldehyds **56** mit Malonsäuredinitril **57** hergestellt (Schema 5-1).⁹⁴



Schema 5-1: Synthese der Arylidenmalonsäuredinitrile **58a-c** (Zur Bezeichnung der Reste (Ar) vgl. Tabelle 5-1.)

Aus den Arylidenmalonsäuredinitrilen wurden im Folgenden die 6-(Phenylsulfanyl)-pyridinderivate **61** nach Kambe et al. synthetisiert (Schema 5-2).⁹⁶ Evdokimov et al. beschrieben die Darstellung der Pyridinderivate durch eine Eintopf-Reaktion mit Aldehyd,

Malonsäuredinitril und Thiophenol im Verhältnis 1:2:1, die auch erfolgreich für die Synthese der Verbindung **61a** angewendet wurde.⁹⁷ Darüber hinaus postulierten Evdokimov et al. einen Reaktionsmechanismus, bei dem das Malonsäuredinitril **57** in einer Michael-Addition am Arylidenmalonsäuredinitril **58** angreift, das Thiophenol **59** gleichzeitig an die Nitrilgruppe des Malonsäuredinitrils addiert wird und es zur Zyklisierung zum Dihydropyridin **60** kommt. Dieses wird schließlich zum aromatischen System **61** oxidiert, indem es formal ein Äquivalent molekularen Wasserstoff abgibt (zum Ablauf der Oxidation vgl. Abschnitt 5.1.1.3).



Schema 5-2: Synthese der Pyridinderivate **61a-c** (Zur Bezeichnung der Reste (Ar) vgl. Tabelle 5-1.)

Bei der Reaktion von 2-(2-Methoxybenzyliden)malonsäuredinitril **58b** mit Malonsäuredinitril und Thiophenol wurden zwei Produkte erhalten. Durch Säulenchromatographie konnten die beiden Verbindungen isoliert werden und deren Struktur mittels NMR-Spektrometrie aufgeklärt werden. Bei dem einen Produkt handelt es sich um das gewünschte Pyridin **61b**, denn im ^1H -NMR-Spektrum sind neben den Signalen für die Aminogruppe, die Methoxygruppe und die aromatischen Protonen keine weiteren Signale vorhanden. Im ^1H -

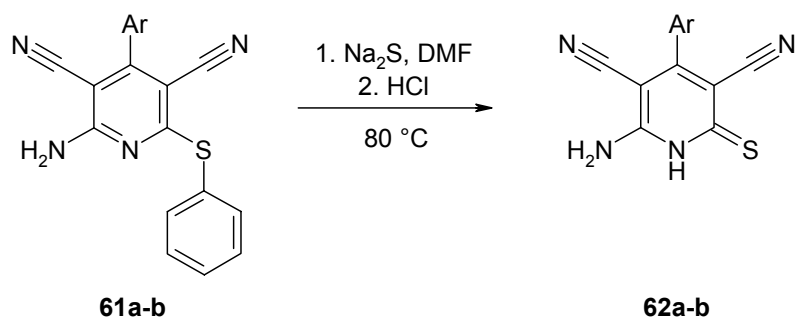
NMR-Spektrum der zweiten isolierten Verbindung ist ein Signal für eine NH-Gruppe bei 9.17 ppm und ein Signal für ein einzelnes Proton bei 4.73 ppm zu sehen. Bei dieser Verbindung handelt es sich um das nicht oxidierte Dihydropyridin **60b**, das Signal bei 4.73 ppm steht für das Proton in Position 4 des Dihydropyridins. Die Oxidation zum Pyridin verlief offensichtlich nicht vollständig.

Die Synthese des Pyridinderivates **61c** mit einem ortho-Iodsubstituenten des 4-Arylrings lieferte nur relativ geringe Ausbeuten, die außerdem stark verunreinigt waren. Deswegen wurde für die Darstellung des Thioxopyridins **62c** sowie weiterer Thioxopyridine ein anderer Syntheseweg gewählt (siehe Abschnitt 5.1.1.2).

Im letzten Schritt wurden die Thioxopyridine **62a-b** durch Behandlung der Pyridinderivate **61a-b** mit Natriumsulfid in DMF nach einer Vorschrift von Chang et al. hergestellt (Schema 5-3).⁹⁴

Evans und Kinnard berichteten, dass bei Diarylsulfiden mit elektronenziehenden Resten (Nitro- oder Nitrilgruppen) der Thioether durch Natriumsulfid gespalten werden kann. Als Produkte erhielten sie die entsprechenden Natrium-Arylsulfide.⁹⁸

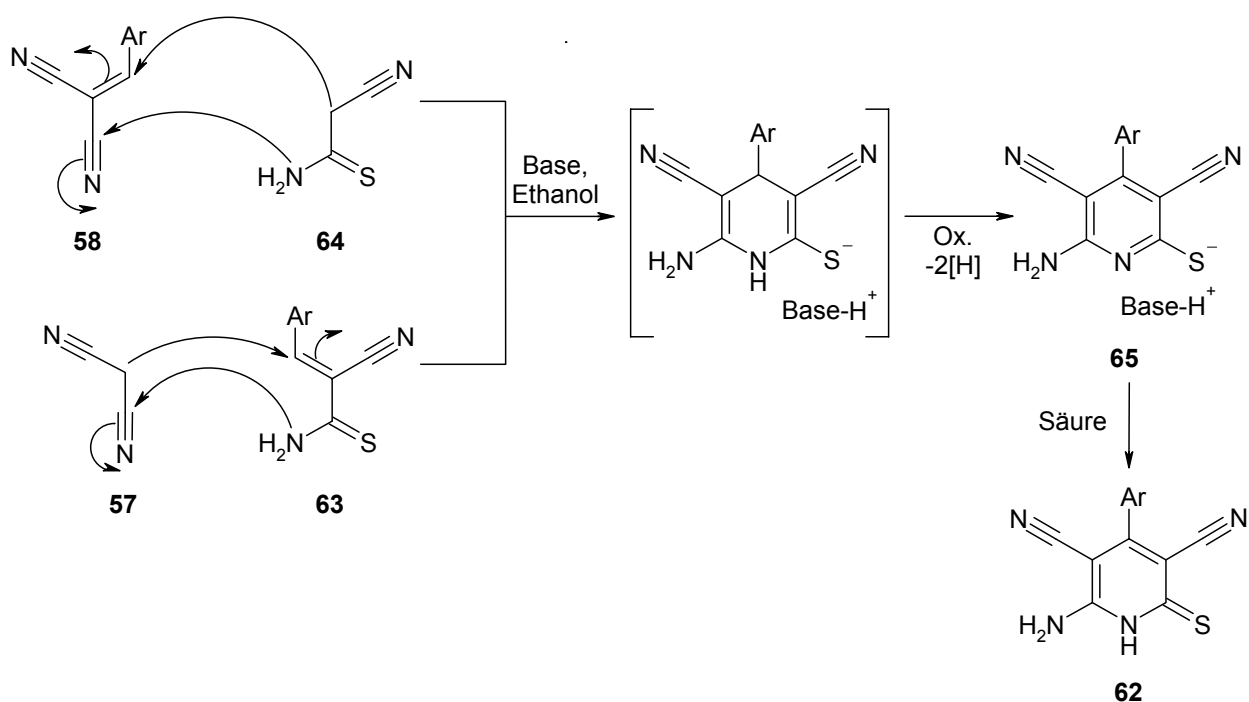
Nach der Umsetzung der Pyridinderivate **61** mit Natriumsulfid entstehen also zunächst die analogen Natrium-Arylsulfide, die dann im nächsten Schritt durch zugesetzte Salzsäure zu den Thioxopyridinen **62** protoniert werden.



Schema 5-3: Synthese der Thioxopyridine **62a-b** (Zur Bezeichnung der Reste (Ar) vgl. Tabelle 5-1.)

5.1.1.2 Einführung des Schwefels durch Cyanthioacetamid

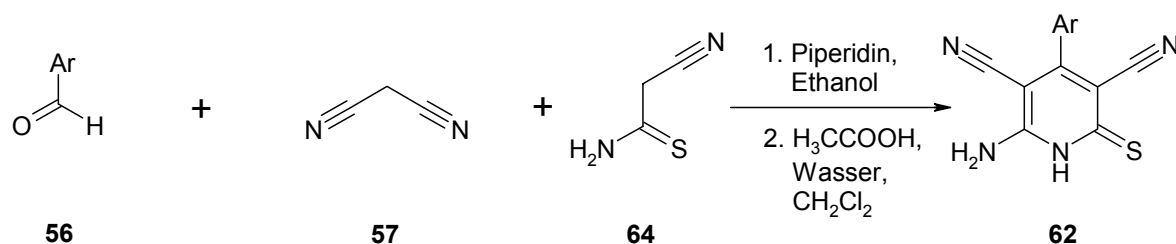
In mehreren Artikeln wurde die Michael-Addition von Cyanthioacetamid **64** bzw. Malonsäuredinitril **57** an Knoevenagel-Produkte wie Arylidenmalonsäuredinitrile **58** bzw. 2-Cyan-3-aryl-2-propenthioamide **63** in siedendem Ethanol unter Zusatz einer Base zu Thioxopyridinen **62** beschrieben (Schema 5-4). Wie bei der Synthese der Pyridinderivate **61** erfolgt auch hier ein Oxidationschritt bei der Entstehung des Pyridin-Grundkörpers. Als Basen wurden zum Beispiel Piperidin oder *N*-Methylmorpholin eingesetzt.⁹⁹⁻¹⁰³ Der mögliche Reaktionsmechanismus nach Zhuang et al. ist in Schema 5-4 beschrieben.¹⁰⁴ Als Zwischenprodukt entsteht zunächst ein Pyridinthiolat **65** mit der protonierten Base als Gegenion. Das Pyridinthiolat wird im Folgenden durch Behandlung mit Säure zum Thioxopyridin **62** protoniert.¹⁰³



Schema 5-4: Synthese der Thioxopyridine **62** (Zur Bezeichnung der Reste (Ar) vgl. Tabelle 5-1.)

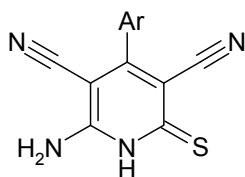
Sharanin et al. beschrieben eine Eintopf-Synthese mit Aldehyd, Cyanthioacetamid und Malonsäuredinitril in äquimolarem Verhältnis unter Zusatz von *N*-Methylmorpholin und anschließender Behandlung mit 10%iger Salzsäure.¹⁰²

In Anlehnung an diese Vorschrift wurde die Eintopf-Synthese mit Piperidin als Hilfsbase zunächst mit unsubstituiertem Benzaldehyd durchgeführt (Schema 5-5). Da kein festes Produkt isoliert werden konnte, wurde versucht, das Produkt mit Dichlormethan zu extrahieren. Dabei fiel auf, dass sich das Produkt nicht gut in Dichlormethan löste, sondern sich als Pulver an der Grenzschicht der beiden Phasen abschied. Daraus wurde eine veränderte Aufarbeitung für alle weiteren Thioxopyridine **62a-I** entwickelt: Nach erfolgter Reaktion wurde das Lösungsmittel Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit Wasser und Essigsäure versetzt und mit Dichlormethan geschüttelt. Das Produkt schied sich als Pulver ab und konnte abgesaugt werden.



Schema 5-5: Eintopf-Synthese der Thioxopyridine **62** (Zur Bezeichnung der Reste (Ar) vgl. Tabelle 5-1.)

Auf diese Weise konnten die Thioxopyridine **62a-I** hergestellt werden (Tabelle 5-1). Da die Produkte ohne weitere Aufarbeitung zur Synthese der Thienopyridine **42**, **43** und **44** bzw. Alkylsulfanylpypidine **54** und **55** verwendet wurden, sind häufig Ausbeuten von über 50% zu beobachten, obwohl das aufgrund des postulierten Reaktionsmechanismus nicht möglich sein sollte (siehe Abschnitt 5.1.1.3). Im ^1H -NMR-Spektrum sind neben den Signalen für die aromatischen Protonen breite Singulets einerseits für die NH-Gruppe im tiefen Feld bei ungefähr 13 ppm, andererseits für die Aminogruppe bei ungefähr 7.5-8.0 ppm vorhanden.

Tabelle 5-1: Synthetisierte Thioxopyridine **62a-l****62**

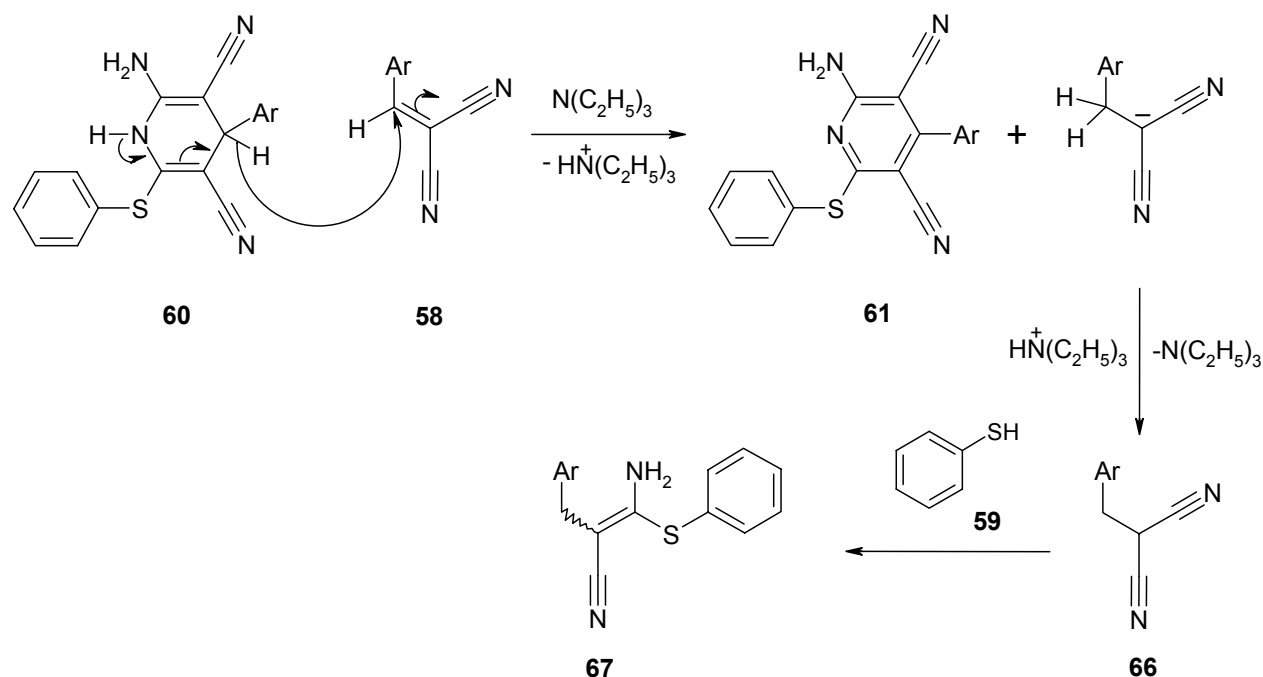
Ar		Ar	
62a	Ph	62g	2-H ₅ C ₂ O-Ph
62b	2-H ₃ CO-Ph	62h	2-H ₃ C-Ph
62c	2-I-Ph	62i	4-Br-Ph
62d	2-Br-Ph	62j	2-Thienyl
62e	2-Cl-Ph	62k	3-Thienyl
62f	2-F-Ph	62l	3-Indolyl

5.1.1.3 Oxidationsschritt bei der Synthese von Thioxopyridinen

Der Oxidationsschritt der Dihydropyridine **60** zu den Pyridinen **61** wurde durch Evdokimov et al. näher untersucht. Bei der Synthese der Pyridine **61**, die zuerst durch Kambe et al. synthetisiert wurden, fiel auf, dass die Ausbeuten nie 50% überschritten. Evdokimov und Mitarbeiter beobachteten außerdem, dass sich kein Wasserstoffgas während der Reaktion bildete und die Reaktion auch in inerter Atmosphäre ablief. Eine Beteiligung von Luftsauerstoff als Oxidationsmittel wurde aus diesen Gründen ausgeschlossen.^{97,105}

Die Autoren postulierten daraufhin, dass die Dihydropyridine durch die Knoevenagel-Intermediate **58** zu Pyridinen oxidiert werden.^{97,105} Zhu et al. beschrieben die Oxidation von Dihydropyridinen durch Benzylidenmalonsäuredinitril näher und postulierten einen initialen Hydrid-Transfer, dem ein schneller Protonen-Transfer folgt.¹⁰⁶ Da bei der Eintopf-Reaktion nach Evdokimov Triethylamin anwesend ist, läuft der Protonen-Transfer wahrscheinlich basenkatalysiert ab (Schema 5-6).

Die reduzierten Verbindungen **66** stehen nun nicht mehr als Edukte zur Verfügung, wodurch die Ausbeute der Pyridine **61** um die Hälfte gesenkt wird. Nach Evdokimov et al. reagieren die Verbindungen **66** mit Thiophenol **59** weiter zu Enaminonitrilen **67** (Schema 5-6).^{97,105}



Schema 5-6: Reaktionsmechanismus der Oxidation von Dihydropyridinen

Reaktionen von 2,6-disubstituierten aromatischen Aldehyden lieferten nach Beschreibungen von Evdokimov et al. keine Pyridinderivate, sondern Dihydropyridine **60** in relativ hohen Ausbeuten von über 50%. Bei solchen 2,6-disubstituierten Derivaten findet die Oxidation aus sterischen Gründen nicht statt, so dass Dihydropyridine **60** als Produkte erhalten wurden.

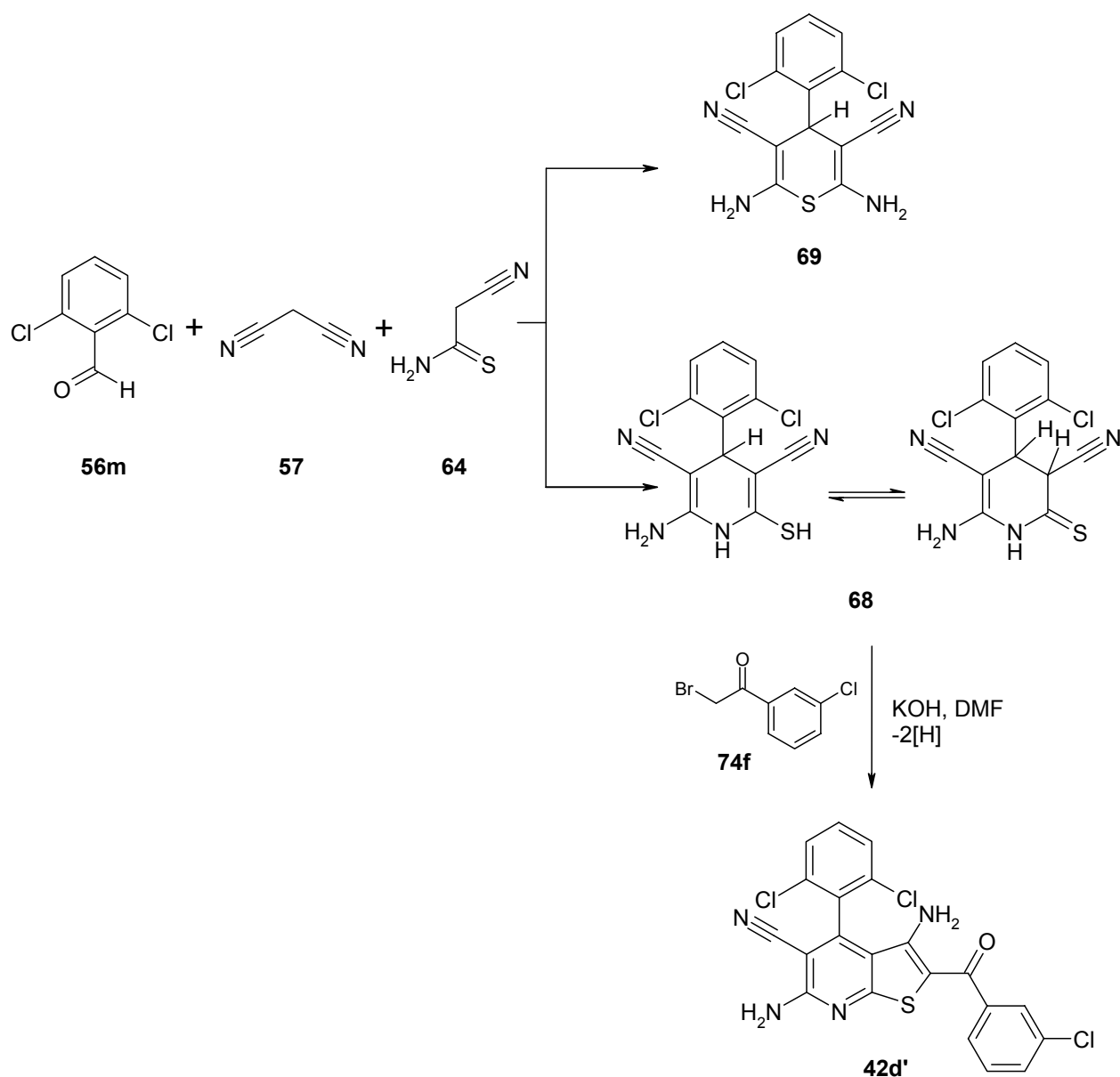
Zhuang et al. formulierten für die Synthese der Thioxopyridine aus Aldehyd, Malonsäuredinitril und Cyanthioacetamid einen ähnlichen Reaktionsmechanismus, bei dem die zunächst entstehenden Dihydropyridine durch die Knoevenagel-Intermediate **58** bzw. **63** oxidiert werden.¹⁰⁴

5.1.1.4 Syntheseversuche zur Darstellung von 6-Amino-4-(2,6-dichlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eintopfreaktion mit 2,6-Dichlorbenzaldehyd **56m**, Malonsäuredinitril **57** und Cyanthioacetamid **64** durchgeführt und als Produkt das Dihydropyridin **68** erwartet (Schema 5-7). Im ^1H -NMR-Spektrum des Produktes taucht auch ein Singulett bei 5.44 ppm mit dem Integral entsprechend einem Proton auf, welches für das Proton in Position 4 des Dihydropyridins steht. Allerdings fallen alle vier Protonen, die an Heteroatome gebunden sind (Signallöschung bei D_2O -Zugabe), unter ein Singulett bei 6.92 ppm, welches vier Protonen entspricht. Diese Tatsache spricht für ein symmetrisch aufgebautes Molekül wie das Thiopyran **69**. Das Entstehen von Strukturen dieser Art wurde schon von Dyachenko und Litvinov bei der Reaktion von Arylidenmalonsäuredinitrilen mit Cyanthioacetamid bei Raumtemperatur beobachtet, während dieselben Edukte in siedendem Ethanol die entsprechenden Thioxopyridine als Produkt lieferten.¹⁰⁰

Bei der Reaktion mit 2,6-Dichlorbenzaldehyd (**56m**) reichte die Reaktionstemperatur anscheinend selbst in siedendem Ethanol aufgrund der sterischen Hinderung nicht aus, um das Dihydropyridin **68** zu synthetisieren, so dass stattdessen das Thiopyran **69** entstand.

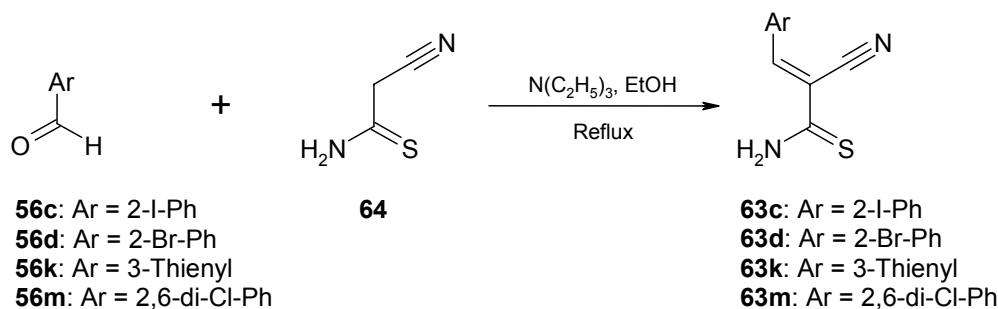
Wurde jedoch das 2-Cyan-3-(2,6-dichlorphenyl)-2-propenthioamid **63m** (hergestellt nach Brunskill et al. in einer Knoevenagel-Reaktion¹⁰⁷, vgl. Schema 5-8) mit Malonsäuredinitril (**57**) umgesetzt, erhielt man ein Produkt, in dessen ^1H -NMR-Spektrum bei 13.33 ppm ein breites Singulett entsprechend einem Proton auftaucht, welches für eine NH-Gruppe stehen könnte. Dieser Verbindung kann die Struktur **68** zugeordnet werden, da aus ihr durch Umsetzung mit dem Phenacylbromid **74f** das gewünschte Thienopyridin **42d'** erhalten wurde (Abschnitt 5.2.2). Die Synthese von Thieno[2,3-*b*]pyridinen durch Reaktion von Thioxodihydropyridin-Derivaten mit Phenacylbromiden wurde bereits von Dyachenko et al. beschrieben. Der Oxidationsschritt findet hierbei erst während der Zyklisierung zum Thiophen statt.¹⁰⁸



Schema 5-7: Synthese des Thiopyrans **69** und des Thieno[2,3-*b*]pyridins **42d'**

5.1.2 Synthese der Thioxochinoline und Thioxonaphthyridine

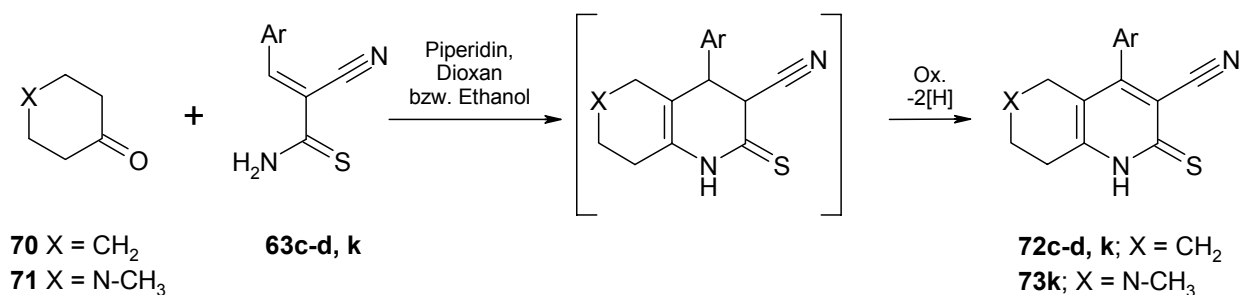
Die 2-Cyan-3-aryl-2-propenthioamide **63** wurden in einer Knoevenagel-Reaktion analog zur Synthese der Arylidenmalonsäuredinitrile **58** aus dem entsprechenden Aldehyd **56** und Cyanthioacetamid **64** mit Triethylamin als Base in Ethanol hergestellt (Schema 5-8).¹⁰⁷ Der Einsatz von Piperidin als Base ist ebenso beschrieben worden.^{109,110} Die Produkte fielen als gelbe bis orangene Kristalle nach dem Abkühlen aus und wurden ohne weitere Reinigung zur Synthese der Thioxochinoline **72** und Thioxonaphthyridine **73** eingesetzt.



Schema 5-8: Synthese der 2-Cyan-3-aryl-2-propenthioamide **63**

Die Thioxochinoline **72** wurden durch Umsetzung der 2-Cyan-3-aryl-2-propenthioamide **63** mit Cyclohexanon **70** in Dioxan mit Piperidin als Basenkatalysator in Anlehnung an eine Vorschrift von Elnagdi et al. erhalten.¹¹¹ Dabei wurde abweichend von der Vorschrift, bei der es sich um eine Eintopf-Synthese handelt, Cyclohexanon in Dioxan vorgelegt und das 2-Cyan-3-aryl-2-propenthioamid in kleineren Portionen nach und nach zugegeben.

Die Thioxonaphthyridine **73** wurden auf einem ähnlichen Weg aus den 2-Cyan-3-aryl-2-propenthioamiden **63** und *N*-Methylpiperidon **71** hergestellt. Als Lösungsmittel wurde jedoch anstelle des Dioxans Ethanol verwendet.¹¹² Im Schema 5-9 ist der Reaktionsmechanismus der Synthese der Thioxochinoline bzw. -naphthyridine aufgeführt. Er verläuft ähnlich wie bei der Synthese der Thioxopyridine **62**: Nach Michael-Addition des Cyclohexanons bzw. *N*-Methylpiperidons und gleichzeitiger Zyklisierung schließt sich die Oxidation zu den Endprodukten an.



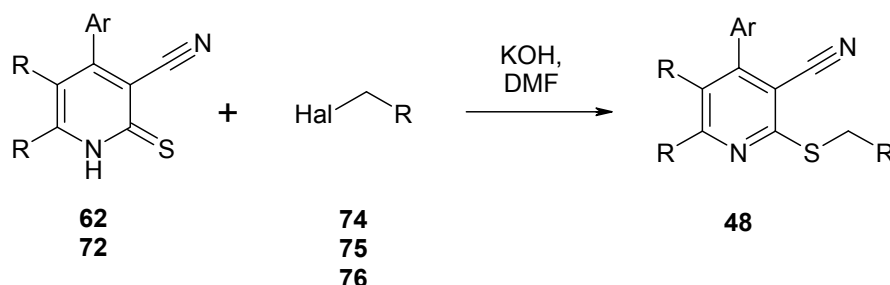
Schema 5-9: Synthese der Thioxochinoline **72** und Thioxonaphthyridine **73** (Zur Bezeichnung der Reste (Ar) vgl. Tabelle 5-1.)

5.2 Synthese der Thienopyridine

5.2.1 Alkylierung und Thorpe-Ziegler-Reaktion

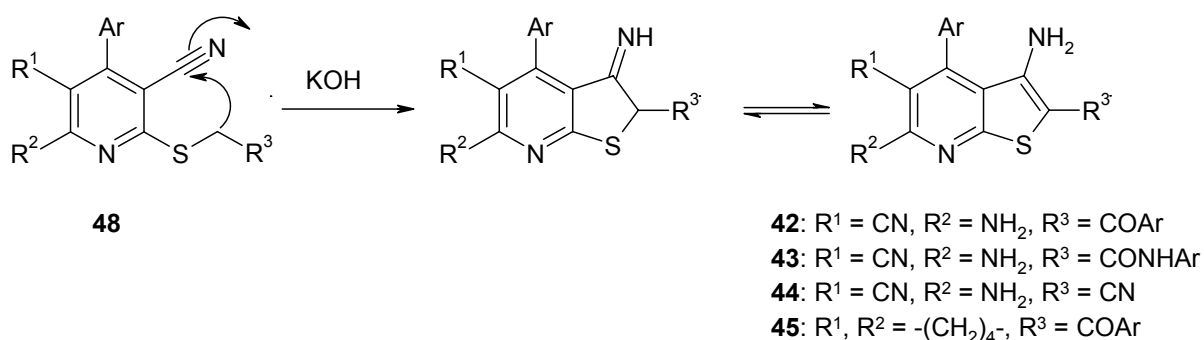
In diesem Abschnitt wird der allgemeine Syntheseweg näher beleuchtet, auf dem die Thienopyridine **42**, **43** und **44** sowie die 5,6,7,8-Tetrahydrothienochinoline **45** dargestellt wurden.

Die Thioxopyridine **62b-h**, **j**, **l** sowie die Thioxochinoline **72c-d** wurden zunächst mit verschiedenen Alkylhalogeniden in DMF mit einem Äquivalent Kalilauge zu den Zwischenstufen **48** alkyliert (Schema 5-10).



Schema 5-10: Allgemeine Synthese der 2-Alkylthiopyridine **48**

Bei dem Rest R der Alkylhalogenide handelt es sich um eine elektronenziehende Gruppe. Als Alkylhalogenide wurden verschiedene Phenacylbromide **74a-n**, 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid **75** und Chloracetonitril **76** verwendet. Zur Synthese der Thienopyridine **42-45** wurde die Zwischenstufe **48** nicht isoliert, sondern es wurde ein weiteres Äquivalent Kalilauge zum Reaktionsansatz hinzugegeben, das den Ringschluss zum Thiophen in einer Thorpe-Ziegler-Reaktion bewirkte (Schema 5-11).



Schema 5-11: Thorpe-Ziegler-Reaktion

Die Thorpe-Reaktion beschreibt ursprünglich die Addition eines α -Kohlenstoffes eines Nitrils an die Nitrilgruppe eines zweiten Moleküls unter Basenkatalyse, wodurch ein Enamin entsteht. Läuft die Reaktion intramolekular ab, wird sie Thorpe-Ziegler-Reaktion genannt. Andere aktivierte Methylengruppen, wie in diesem Fall durch das Vorhandensein des elektronenziehenden Restes R, können ebenso addiert werden.¹¹³

Verbindungen wie **42**, **43**, **44** und **45** sind bereits literaturbekannt. Insbesondere Dyachenko, Litvinov und Mitarbeiter beschäftigten sich mit der Darstellung solcher Thienopyridine durch Alkylierung und nachfolgender Thorpe-Ziegler-Zyklisierung und veröffentlichten zahlreiche Artikel und Reviews zu diesem Thema.^{114,115}

Im folgenden Abschnitt werden die Endprodukte, die auf diesem Syntheseweg dargestellt wurden, näher beleuchtet.

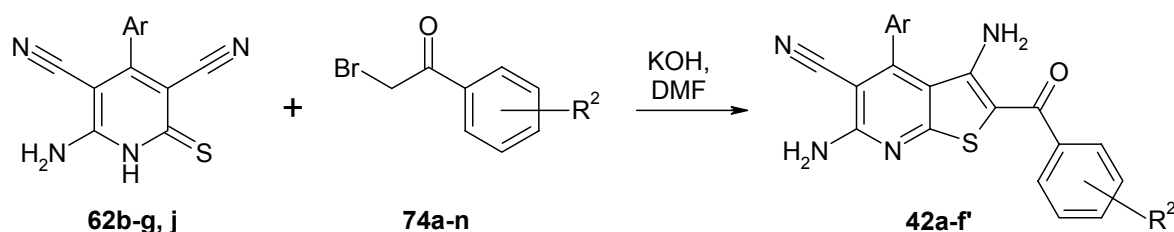
5.2.2 Umsetzung der Thioxopyridine bzw. Thioxochinoline mit Alkylhalogeniden

Der in Abschnitt 5.2.1 beschriebene Syntheseweg wurde für die Darstellung der Verbindungen **42**, **43**, **44** und **45** beschritten:

2-Aroylthienopyridine **42**

Die größte Gruppe der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Thienopyridine umfasst die Verbindungen **42** mit einem Aroylrest in Position 2, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Hit-Struktur **41** aufweisen. Eine Veränderung der aromatischen Reste in Position 2 und 4 wird größtenteils durch das Einführen unterschiedlicher Substituenten erreicht. Die meisten der synthetisierten Verbindungen verfügen wie die Hit-Struktur über einen ortho-substituierten Phenylrest in Position 4. Ähnliche Verbindungen mit verschiedenen Arylresten in 4-Position sind in mehreren Artikeln beschrieben worden.^{100,103,108,116,117} Allerdings gibt es erst wenige dieser Substanzen, die über einen ortho-Substituenten im Phenylrest in Position 4 verfügen.^{103,108}

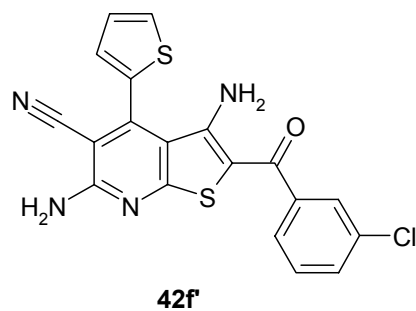
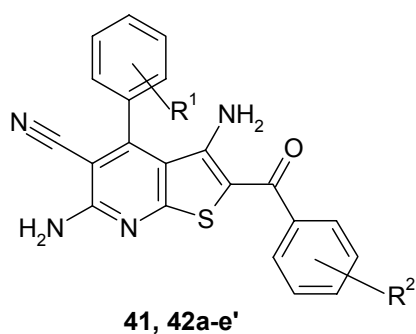
Die Verbindungen **42** wurden durch Umsetzung der Thioxopyridine **62b-g, j** mit verschiedenen Phenacylbromiden **74a-n** gewonnen (Schema 5-12). Eine Übersicht über die synthetisierten Verbindungen ist in Tabelle 5-2 dargestellt.



Schema 5-12: Synthese der 2-Aroylthienopyridine **42a-f'**

Die Hit-Struktur **41** wurde ebenfalls erneut synthetisiert. Die analytischen Daten dieser Verbindung wurden mit den erhobenen Daten einer kommerziell erworbenen Charge verglichen, mit denen sie übereinstimmten. Diese Verbindung wurde von Sharanin et al. zuerst synthetisiert und analytisch charakterisiert. Auch diese Angaben stimmen mit den analytischen Daten der selbst synthetisierten Substanz überein.¹⁰³ Literaturbekannt sind außerdem die beiden Verbindungen **42u**¹⁰⁸ und **42e**.¹¹⁶

Durch den großen ortho-Substituenten des 4-Phenylrestes, den die meisten 2-Aroylthienopyridine **42** besitzen, ist die Drehbarkeit um die Einfachbindung sterisch behindert. Diese Verbindungen können demnach Atropisomere bilden. Ist der 4-Phenylrest mit zwei Chlorsubstituenten symmetrisch in Position 2 und 6 versehen, handelt es sich um eine Verbindung, bei der keine Atropisomerie auftritt. Diese Verbindung **42d'** wurde zusätzlich synthetisiert, um den Einfluss der möglichen Atropisomerenbildung auf die biologische Aktivität zu untersuchen. Als Ausgangssubstanz wurde hier der erhaltene Feststoff aus der Reaktion von 2-Cyan-3-(2,6-dichlorphenyl)-2-propenthioamid (**63m**) mit Malonsäuredinitril (**57**) (vgl. Abschnitt 5.1.1.4) mit dem Phenacylbromid **74f** umgesetzt (Schema 5-7).

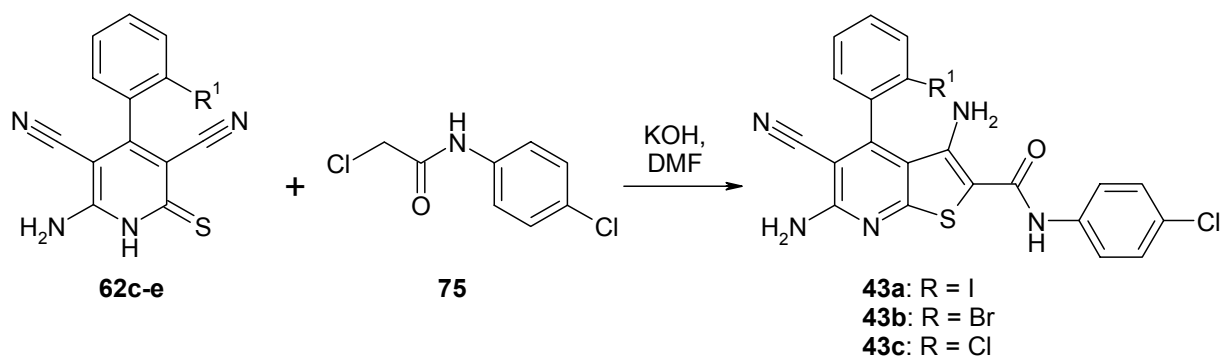
Tabelle 5-2: Synthetisierte 2-Aroylthienopyridine **41** und **42a-f'**

	R ¹	R ²
41	2-I	4-Cl
42a	2-OCH ₃	H
42b	2-OCH ₃	4-Cl
42c	2-OCH ₃	4-OCH ₃
42d	2-OCH ₃	4-CH ₃
42e	2-OCH ₃	4-CF ₃
42f	2-OCH ₃	3-Cl
42g	2-OCH ₃	2-Cl
42h	2-OCH ₃	4-CN
42i	2-I	H
42j	2-I	4-OCH ₃
42k	2-I	4-CH ₃
42l	2-I	4-CF ₃
42m	2-I	3-Cl
42n	2-I	2-Cl
42o	2-I	3,4-Cl
42p	2-OC ₂ H ₅	4-Cl
42q	2-Br	H
42r	2-Br	4-Cl
42s	2-Br	3-Cl

42t	2-Br	3,4-Cl
42u	2-Cl	H
42v	2-Cl	3-Cl
42w	2-Cl	3,4-Cl
42x	2-Cl	3-OCH ₃
42y	2-Cl	3-CF ₃
42z	2-Cl	3-CN
42a'	2-Cl	3-Br
42b'	2-Cl	3-F
42c'	2-F	3-Cl
42d'	2,6-Cl	3-Cl
42e'	H	H
42f'	siehe oben	

Thienopyridin-2-carboxamide **43**

Die Thioxopyridine **62c-e** wurden mit 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid **75** zu den Thienopyridin-2-carboxamiden **43a-c** umgesetzt (Schema 5-13). Hierbei handelt es sich demnach um eine Modifikation auf der Thiophen-Seite in Position 2 des Thienopyridin-Grundgerüsts, verglichen mit der Hit-Struktur **41**. Verbindungen dieser Art sind in der Literatur beschrieben. Dabei handelt sich um solche, die in Position 4 entweder einen para- oder unsubstituierten Phenylring oder einen aliphatischen Rest besitzen.^{91,117}

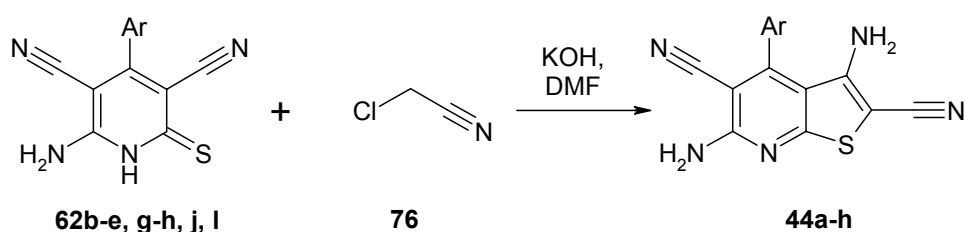


Schema 5-13: Synthese der Thienopyridin-2-carboxamide **43a-c**

Thienopyridin-2-carbonitrile **44**

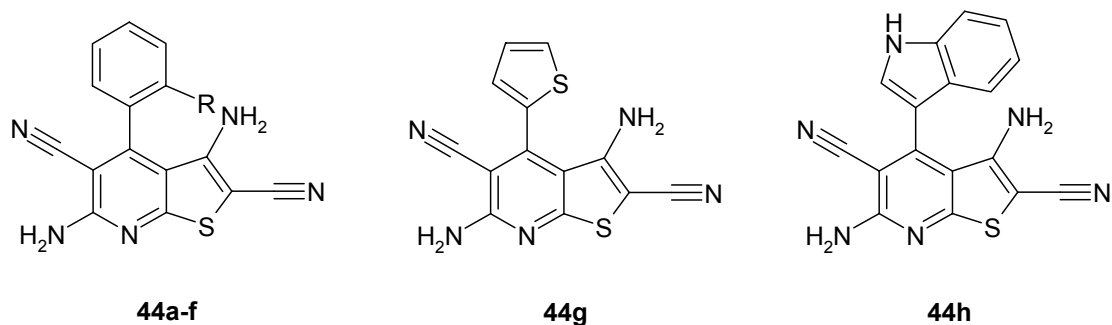
Auch durch die Darstellung der Thienopyridin-2-carbonitrile wird das Molekül auf der Thiophen-Seite modifiziert, ebenso wie bei den Thienopyridin-2-carboxamiden wird der Rest in Position 2 verändert. Die Thioxopyridine **62b-e**, **g-h**, **j**, **l** wurden mit Chloracetonitril **76** zu den Thienopyridin-2-carbonitrilen **44a-h** umgesetzt (Schema 5-14). Verbindungen dieser Art sind in der Literatur bereits beschrieben, allerdings handelt es sich dabei überwiegend um Substanzen mit para-substituiertem Phenylring in Position 4.^{117,118} Ortho-substituierte Derivate sind noch nicht bekannt.

Eine Übersicht über die synthetisierten Verbindungen **44** stellt Tabelle 5-3 dar.



Schema 5-14: Synthese der Thienopyridin-2-carbonitrile **44a-h**

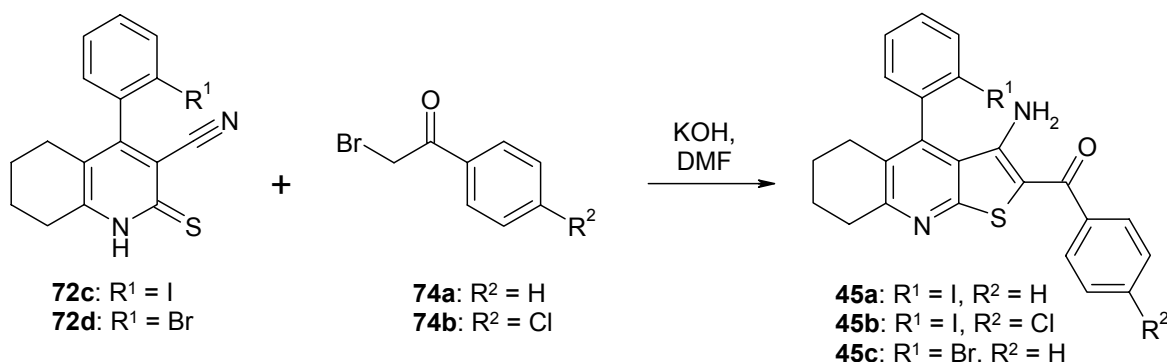
Tabelle 5-3: Synthetisierte Thienopyridin-2-carbonitrile **44a-h**



R		R	
44a	OCH ₃	44e	OC ₂ H ₅
44b	I	44f	CH ₃
44c	Br	44g	siehe oben
44d	Cl	44h	siehe oben

Thienochinoline **45**

Die Thioxochinolin-Derivate **72c-d** wurden mit den Phenacylbromiden **74a-b** zu den Thienochinolin-Derivaten **45a-c** umgesetzt (Schema 5-15). Hier werden im Gegensatz zu den oben beschriebenen Modifikationen auf der Pyridin-Seite des Moleküls Veränderungen vorgenommen. Anstelle der Nitrilgruppe in Position 5 und der Aminogruppe in Position 6 wird hier ein Cyclohexenring anneliert. Ähnliche Strukturen wurden von Dyachenko et al. und Sharanin et al. beschrieben.^{119,120} Am 4-Arylring ortho-substituierte Derivate sind noch nicht bekannt.



Schema 5-15: Synthese der Thienochinoline **45a-c**

5.2.3 Zuordnung der Signale in den ¹H-NMR-Spektren der Verbindungen **42**, **43**, **44** und **45**

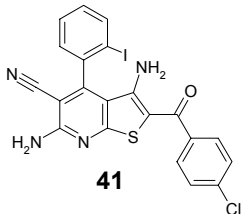
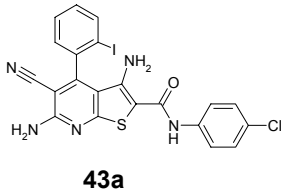
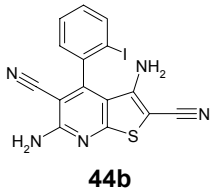
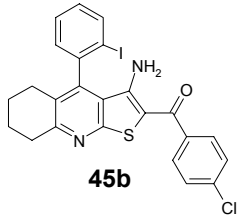
Beispielhaft wurden die Signale der Verbindungen **41**, **43a**, **44b** und **45b** verglichen (Tabelle 5-4). Insbesondere die Zuordnung der verschiedenen Aminogruppen ist hier von Bedeutung.

Alle Verbindungen verfügen über einen 2-Iodphenylrest in Position 4 des Thienopyridins bzw. -chinolins. Die Signale dieser aromatischen Protonen sind in Hinblick auf chemische Verschiebung und Aufspaltung bei allen vier Verbindungen sehr ähnlich. Die aromatischen Protonen des anderen Phenylrestes mit dem 4-Chlorsubstituenten spalten bei den Verbindungen **41**, **43a** und **45b** in einem AA'XX'-System auf. Die chemischen Verschiebungen sind bei **41** und **45b** vergleichbar, bei Verbindung **43a** sind die Signale etwas ins höhere Feld verschoben. Dieser Unterschied lässt sich durch die Amid-Struktur in **43a** erklären.

Die Verbindungen **41**, **43a** und **44b** zeigen im Bereich zwischen 7.5 und 7.8 ppm ein breites, aber deutliches Signal, dessen Integral zwei Protonen entspricht. Teilweise wird

eine Überlagerung mit aromatischen Protonen beobachtet. Dieses Signal wird der Aminogruppe in Position 6 zugeordnet, denn die Verbindung **45b** hat keine Aminogruppe in Position 6 und verfügt auch nicht über ein entsprechendes Signal in diesem Bereich.

Tabelle 5-4: Übersicht über die ^1H -NMR-Signale der aromatischen und heteroatomar gebundenen Protonen

	Aromatische Protonen		An Stickstoff gebundene Protonen
	4-(2-Iodphenyl)	4-Chlorphenyl	
 <p>41</p>	7.41 (dt, 1 H), 7.59 (überlagert, 1 H), 7.68 (überlagert, 1 H), 8.15 (dd, 1 H)	7.58-7.59 (m, 2 H), 7.71-7.72 (m, 2 H)	5.85-7.10 (sehr breites Singulett*) 7.81 (s, 2 H)
 <p>43a</p>	7.37 (dt, 1 H), 7.57 (dd, 1 H), 7.67 (überlagert, 1 H), 8.12 (dd, 1 H)	7.33-7.35 (m, 2 H), 7.65-7.68 (m, 2 H)	5.66 (s, 2 H), 7.50-7.61 (überlagert, 2 H), 9.45 (s, 1 H)
 <p>44b</p>	7.39 (dt, 1 H), 7.57 (dd, 1 H), 7.67 (dt, überlagert, 1 H), 8.12 (dd, 1 H)	-	5.19 (s, 2 H), 7.67 (überlagert, 2 H)
 <p>45b</p>	7.36 (dt, 1 H), 7.45 (dd, 1 H), 7.67 (dt, 1 H), 8.15 (dd, 1 H)	7.60-7.62 (m, 2 H), 7.77-7.79 (m, 2 H)	5.50-7.05 (sehr breites Singulett*)

*Integral nicht exakt auswertbar

Das Signal der Aminogruppe in Position 3 erscheint je nach Art des Restes in Position 2 mehr oder weniger ausgeprägt. Wenn sich dort ein Benzoylrest wie bei den Verbindungen **41** und **45b** befindet, also ein vinyloges Amid vorhanden ist, tritt ein sehr breites, kaum sichtbares Signal zwischen 5.0 und 7.5 ppm auf, dessen Integral häufig weniger als zwei Protonen entspricht. Die charakteristische Form dieses Signals im ^1H -NMR-Spektrum ist bei allen Verbindungen **42** und **45** zu beobachten.

Bei Verbindung **43a** ist eine vinyloge Harnstoffstruktur vorhanden. Das Signal für die NH-Gruppe liegt bei 9.45 ppm. Die Aminogruppe in 3-Position ergibt ein deutliches Signal bei 5.66 ppm mit einer Intensität von 2 H. Entsprechendes wird im Spektrum von **44b** beobachtet. Auch dort erscheint ein klar identifizierbares Signal der 3-Aminogruppe bei 5.19 ppm mit einer Intensität von 2 H.

5.3 Modifizierung des Moleküls auf der Seite des Thiophens durch Zyklisierung

Auf der Thiophen-Seite des Moleküls wurde bei den Verbindungen **43** und **44** nur der Rest in Position 2 verändert. Dies wurde durch Umsetzung der Thioxopyridine mit verschiedenen Alkylhalogeniden erreicht. Die folgenden Modifikationen des Moleküls auf der Thiophen-Seite beziehen die Aminogruppe in Position 3 mit ein. Darüberhinaus werden die Modifikationen am fertigen Thienopyridin vorgenommen. Als Ausgangsverbindungen dienen die Thienopyridin-2-carbonitrile **44** und 2-Aroylthienopyridine **42**.

5.3.1 Thienopyridin-2-carbonitrile **44** als Ausgangsstoffe

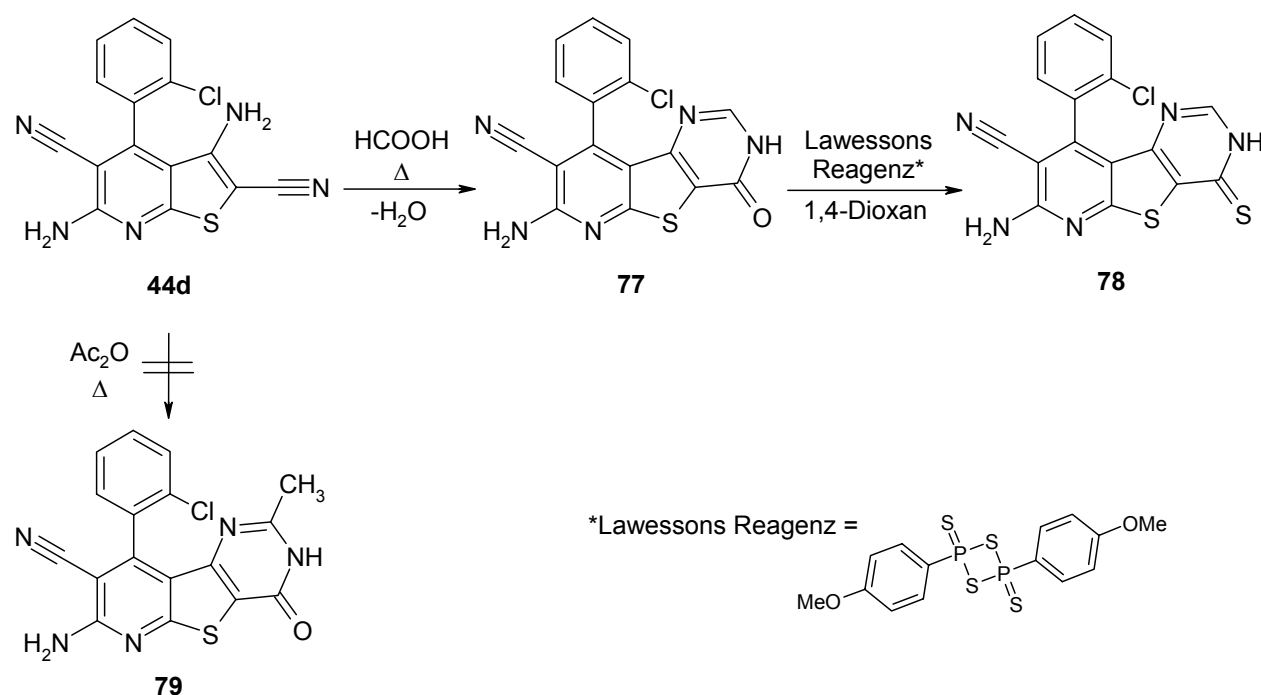
Gad-Elkareem et al. beschrieben verschiedene Reaktionen mit Thienopyridin-2-carbonitrilen **44**, die allerdings in Position 4 einen Phenylring mit einem 4-Methoxy-substituenten tragen¹¹⁸. Interessant war in diesem Zusammenhang die Darstellung verschiedener Pyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-Derivate. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich analoge Reaktionen auch ausgehend von **44d** durchführen lassen.

5.3.1.1 Reaktion mit Ameisensäure/Acetanhydrid

Zunächst wurde 3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44d**) durch Erhitzen zum Rückfluss in Ameisensäure unter Abspaltung von Wasser zum

7-Amino-9-(2-chlorphenyl)-4-oxo-3,4-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-d]pyrimidin-8-carbonitril **77** umgesetzt.

Der Sauerstoff konnte im Folgenden mit Lawessons Reagenz in kochendem 1,4-Dioxan gegen Schwefel ausgetauscht werden (Schema 5-16).¹²¹



Schema 5-16: Reaktionen von **44d** mit Ameisensäure bzw. Acetanhydrid

Gad-Elkareem et al. setzten 3,6-Diamino-4-(4-methoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril unter analogen Reaktionsbedingungen auch mit Acetanhydrid zu dem in Position 2 methylierten Derivat um. Die Übertragung dieser Reaktion auf die Verbindung **44d** als Edukt führte allerdings nicht zu dem gewünschten Produkt **79** (Schema 5-16).

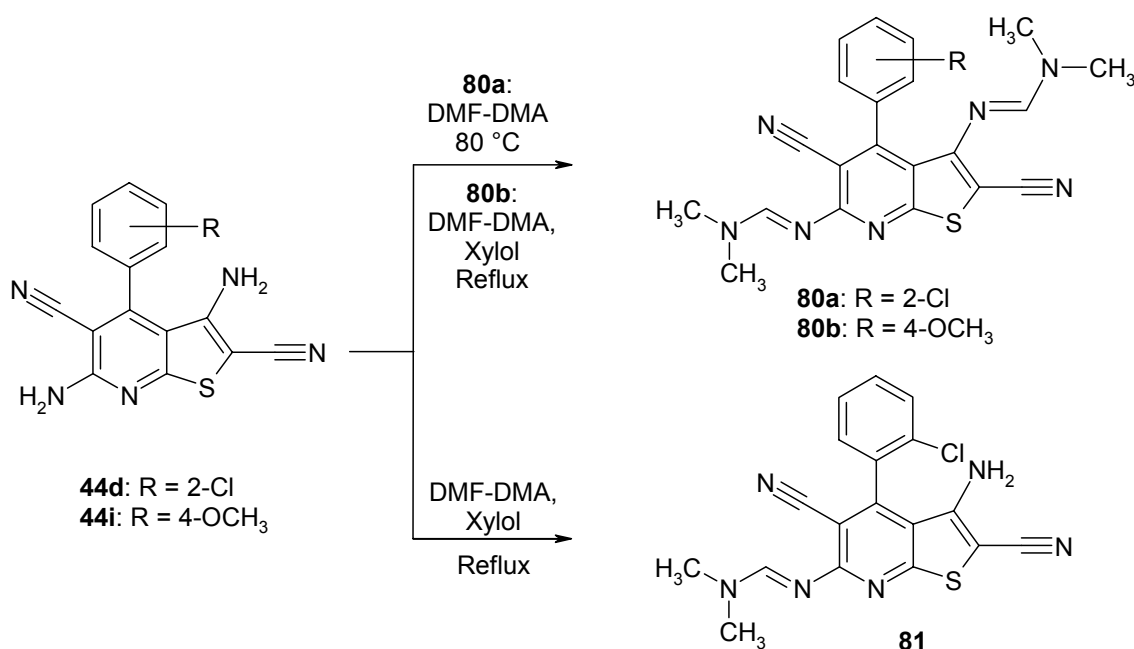
5.3.1.2 Reaktion mit Dimethylformamid-Dimethylacetal (DMF-DMA) und Anilinen

Die Autoren beschrieben auch die Umsetzung der Verbindung 3,6-Diamino-4-(4-methoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril mit zwei Äquivalenten DMF-DMA in Xylol zum Diamidin **80b** (Schema 5-17).¹¹⁸

Diese Reaktion sollte auf die Verbindung **44d** übertragen werden. Dabei entstand allerdings ein Produkt, bei dem noch eine freie Aminogruppe vorhanden ist. Im ¹H-NMR-Spektrum ist bei 5.32 ppm ein Signal für eine Aminogruppe zu sehen (Signallöschung bei D₂O-Zugabe). Bei Vergleich mit den Angaben über die Lage der Signale für die Aminogruppen der Verbindungen **41**, **43a**, **44b** und **45b** (vgl. Tabelle 5-4) lässt sich die

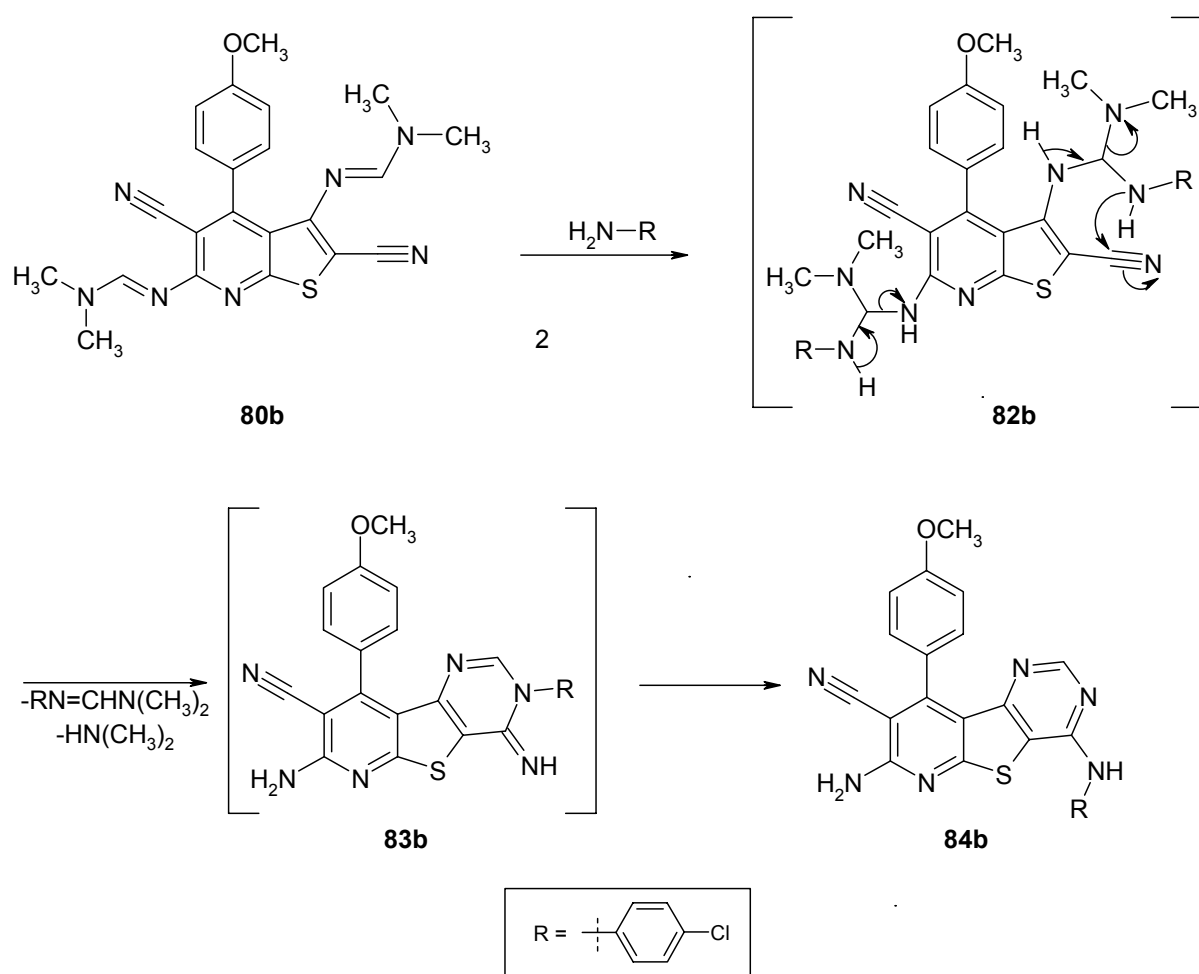
Struktur **81** beschreiben. Es hat also nur die Aminogruppe in Position 6 mit DMF-DMA reagiert. Ausgehend von der Hit-Struktur **41** stellt **81** demnach eine Verbindung dar, die auf der Pyridin-Seite des Thienopyridin-Grundkörpers modifiziert ist (Schema 5-17).

Die Verbindung **80a** konnte durch Umsetzen der Ausgangsverbindung **44d** in DMF-DMA ohne weiteren Lösungsmittelzusatz bei 80 °C und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung gewonnen werden. Das DMF-DMA wurde in diesem Fall also nicht nur als Reaktionspartner, sondern auch als Lösungsmittel verwendet (Schema 5-17).



Schema 5-17: Reaktionen von Thienopyridin-2-carbonitrilen mit DMF-DMA

Gad-Elkareem et al. beschrieben im Folgenden die Umsetzung des Diamidins **80b** mit zwei Äquivalenten 4-Chloranilin zum *N*-Phenylpyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin **84b**. Schema 5-18 zeigt den von der Arbeitsgruppe postulierten Mechanismus dieser Reaktion. Dabei werden die Aniline zunächst an die Amidgruppen addiert (**82b**). Im nächsten Schritt entsteht auf der Pyridin-Seite des Moleküls in Position 6 die freie Aminogruppe durch Abspaltung von *N'*-(4-Chlorphenyl)-*N,N*-dimethylimidoformamid, während auf der Thiophen-Seite durch Zyklisierung ein Pyrimidinring gebildet wird, bei dem der Chlorphenylrest an einem der Pyrimidin-Stickstoffe gebunden ist (**83b**). Durch Dimroth-Umlagerung entsteht schließlich das Endprodukt **84b** mit dem exozyklisch gebundenen Chlorphenylrest.¹¹⁸



Schema 5-18: Reaktionsmechanismus nach Gad-Elkareem zur Darstellung des *N*-Phenylpyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4-amins **84b**¹¹⁸

Bei der Übertragung dieser Reaktion auf die Verbindung **80a** wurde nicht das gewünschte Produkt entsprechend **84b** erhalten. Im ^1H -NMR-Spektrum des isolierten Produktes sind noch zwei Signale im hohen Feld für zwei Methylgruppen zu sehen. Das Signal für eine Aminogruppe fehlt. Man kann allerdings davon ausgehen, dass ein Molekül 4-Chloranilin addiert worden ist, da im Spektrum ein AA'XX'-System für den 1,4-disubstituierten Phenylring und zwei Singulett für das Pyrimidin-CH und das Amidin-CH zu identifizieren sind. Zusätzlich wird ein Signal, welches vom AA'XX'-System überlagert wird, durch D_2O -Zugabe gelöscht. Dieses Signal kann also für eine NH-Gruppe stehen. Als Produkt lässt sich also die Struktur **85** beschreiben. Elementaranalyse, ^{13}C -NMR-Spektrum und IR-Spektrum unterstützen diese Struktur-Zuordnung.

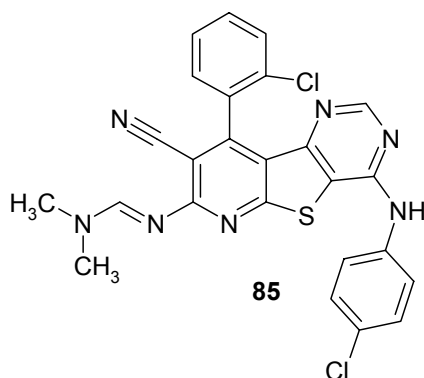
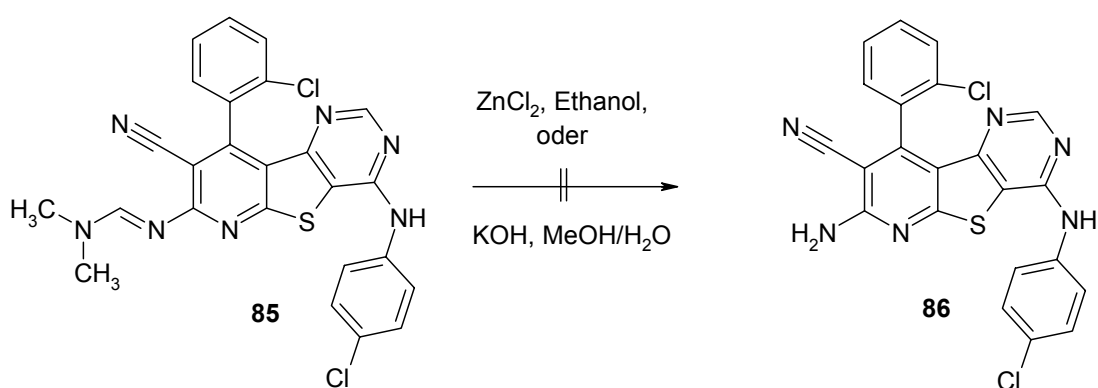


Abbildung 5-1: Verbindung **85**

Um die freie Aminogruppe zu erhalten, wurde versucht, das Amidin nachträglich unter Anwendung verschiedener Methoden zu spalten (Schema 5-19). Einerseits wurde die Verbindung **85** nach einer Vorschrift von Toste et al. mit einem Überschuss an Zinkchlorid in absolutem Ethanol zum Rückfluss erhitzt.¹²² Im Dünnschichtchromatogramm konnte auch nach längerer Reaktionszeit (>13 h) unter diesen Bedingungen kein Produktfleck identifiziert werden. Auch eine Kontrolle mittels HPLC zeigte nur die Anwesenheit der Ausgangsverbindung **85** im Reaktionsansatz.

Nach Meyers et al. wurde **85** in einem zweiten Versuch, das Amidin zu spalten, mit KOH in einem Methanol/Wassergemisch erwärmt.¹²³ Es wurde ein Produktgemisch erhalten, aus dem jedoch keine Substanz isoliert werden konnte.

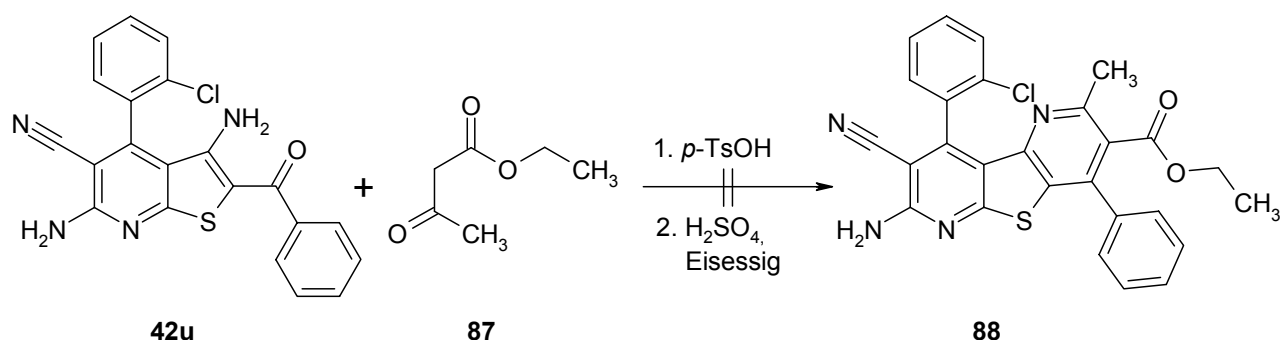


Schema 5-19: Versuche zur Spaltung des Amidins **85**

5.3.2 2-Aroylthienopyridine **42** als Ausgangsstoffe

5.3.2.1 Friedländer-Synthese

Bei der Friedländer-Synthese reagieren ortho-Aminoarylaldehyde bzw. -ketone mit Ketonen mit aktivierter Methylengruppe zu Chinolinen. Diese Reaktion kann basen- oder säurekatalysiert sein. Da in den Verbindungen **42** auch eine ortho-Aminoarylketon-Teilstruktur vorhanden ist, sollte eine Friedländer-Reaktion ausprobiert werden (Schema 5-20).

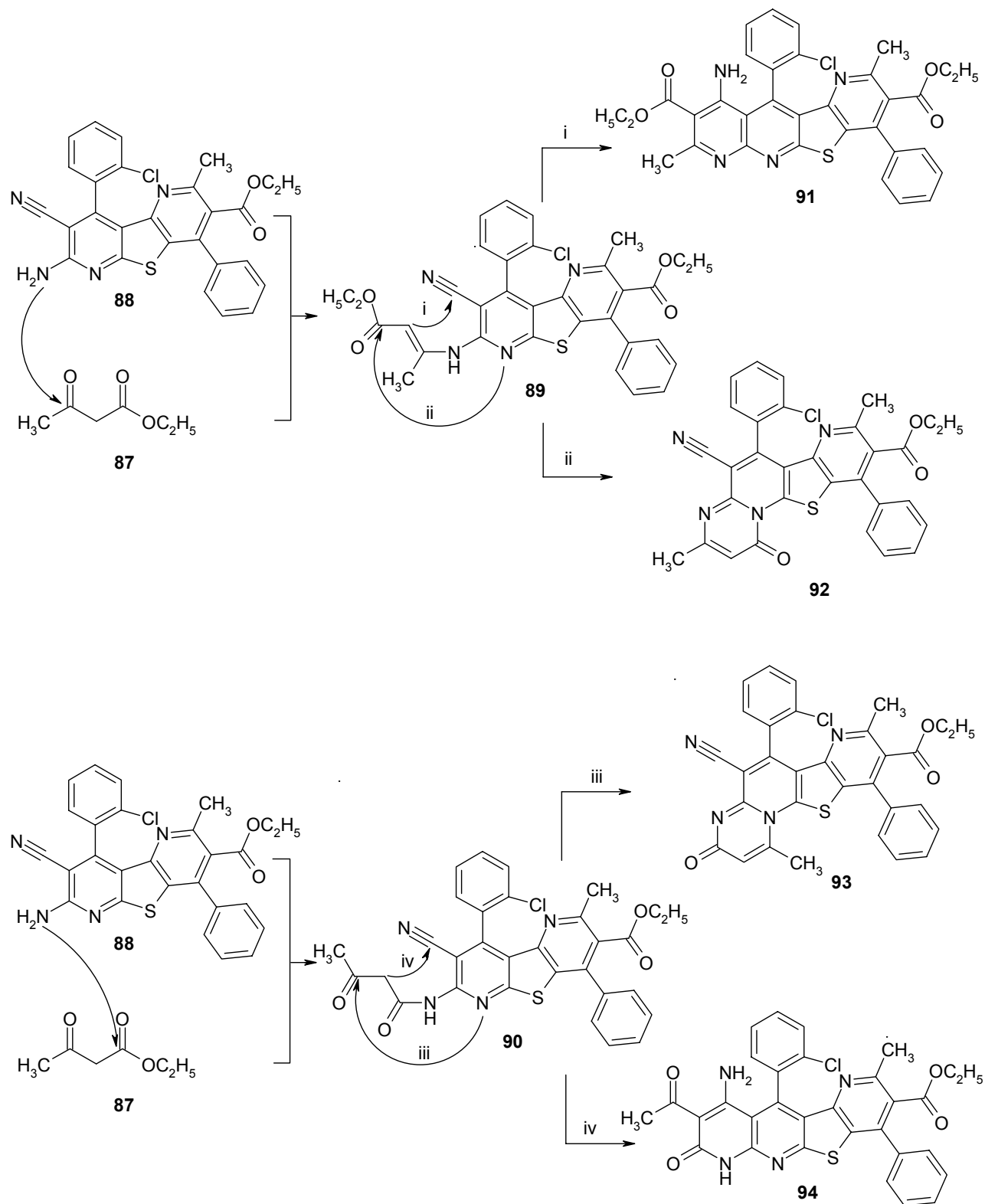


Schema 5-20: Versuche zur Friedländer-Synthese

Dazu wurde **42u** mit Acetessigsäureethylester (**87**) nach einer Vorschrift von Jia et al. in der Mikrowelle umgesetzt (Schema 5-20, 1.).¹²⁴ Es konnte ein Produkt isoliert werden, welches jedoch nicht identisch mit **88** ist. Im ¹H-NMR-Spektrum sind die Signale für die aromatischen Protonen und die Ethylgruppe des Esters zu identifizieren. Allerdings ist kein Signal für eine Aminogruppe zu erkennen, stattdessen treten zwei Singuletts für Methylgruppen auf. Im ¹³C-NMR-Spektrum erscheinen insgesamt vier Signale mehr als erwartet, die einem primären, einem tertiären und zwei quartären Kohlenstoffatomen entsprechen. Diese Tatsachen sprechen dafür, dass die 2-Aminonicotinonitril-Struktur auf der Pyridin-Seite des Moleküls ebenfalls mit Acetessigsäureethylester reagiert hat.

In Schema 5-21 sind die verschiedenen Möglichkeiten abgebildet, wie Acetessigsäureethylester mit der 2-Aminonicotinonitril-Struktur auf der Pyridin-Seite theoretisch reagieren könnte. Zu erwarten wäre anfangs die Bildung eines Enamins durch Angriff der Aminogruppe an der im Vergleich zu Estergruppe reaktiveren Ketofunktion des Acetessigsäureethylesters (Schema 5-21, oben). Diese Zwischenstufe **89** kann dann durch Angriff an der Nitrilgruppe zum Produkt **91** reagieren (Schema 5-21, i), das eine weitere Estergruppe trägt. In der Literatur wird diese Reaktion häufig bei der Umsetzung von 2-

Aminobenzonitrilen mit Acetessigsäureethylester und anderen β -Oxoketonen mit Zinn(II)chlorid als Lewisäure beschrieben.^{125,126}



Schema 5-21: Mögliche Reaktionen von Verbindung **88** mit Acetessigsäureethylester

Andererseits kann ausgehend von der Zwischenstufe **89** durch Angriff des Pyridin-Stickstoffes an der Ester-Carbonylgruppe auch das 3-Methyl-1-oxo-1*H*-pyrido[2'',3'':4',5']-thieno[3',2':5,6]pyrido[1,2-*a*]pyrimidin **92** (Schema 5-21, ii) gebildet werden. Diese Art der Reaktion ist in der Literatur beschrieben worden.¹²⁷⁻¹²⁹

Suri et al. beobachteten bei der Reaktion von 2-Aminopyridinen und Acetessigsäure-ethylester durch Erhitzen mittels Mikrowellen auch eine Amidbildung durch Angriff der Aminogruppe an der Esterfunktion und Entstehung von *N*-(1,3-Dioxobutyl)-2-aminopyridine.¹³⁰ In diesem Fall würde als untypische Zwischenstufe die Verbindung **90** resultieren (Schema 5-21, unten). Durch Angriff des Pyridin-Stickstoffes an der Carbonylgruppe des Esters würde im Folgenden das 1-Methyl-3-oxo-3*H*-pyrido[2'',3'':4',5']-thieno[3',2':5,6]pyrido[1,2-*a*]pyrimidin **93**, ein Stellungisomer zur Verbindung **92**, entstehen (Schema 5-21, iii). Isomere dieser Art erhielten auch Suri et al. nach Umsetzung der erhaltenen *N*-(1,3-Dioxobutyl)-2-aminopyridine mit Polyphosphorsäure.¹³¹

Reagiert hingegen ausgehend von der Zwischenstufe **90** die Methylengruppe mit der Nitrilgruppe, würde die Verbindung **94** resultieren (Schema 5-21, iv). Für diese Reaktion wurden jedoch keine Beispiele in der Literatur gefunden.

Das Vorliegen der Verbindungen **91** und **94** konnte schnell ausgeschlossen werden, da diese Strukturen mit den analytischen Daten nicht in Einklang zu bringen waren. Ein nasschemischer Nachweis mit Ehrlichs Reagenz fiel negativ aus, eine freie Aminogruppe ist also nicht vorhanden. Dies wird dadurch bekräftigt, dass nach Zugabe von D₂O zur Probe keine Signale im ¹H-NMR-Spektrum gelöscht wurden. Die Struktur der Substanz enthält demnach keine Protonen, die an Heteroatome gebunden sind. Ein Molpeak bei (m/z) = 564 im Massenspektrum spricht ebenso gegen das Vorliegen der Verbindungen **91** und **94**.

Die Unterscheidung zwischen den Isomeren **92** und **93** (Abbildung 5-2) gestaltete sich dagegen als weitaus schwieriger. Mit dem Ziel der Strukturaufklärung wurden zweidimensionale NMR-Techniken angewandt.

Das HSQC stellt die C,H-Korrelation über ¹J-Kopplung dar und erlaubt somit eine Zuordnung der tertiären Kohlenstoffatome. Ein Kreuzpeak im HSQC ist bei den Protonen und Kohlenstoffatomen zu sehen, die direkt aneinander gebunden sind.

Das HMBC stellt Korrelationen zwischen Protonen und Kohlenstoffatomen über zwei, drei oder vier Bindungen dar. Dadurch ist auch die Zuordnung quartärer Kohlenstoffatome möglich.

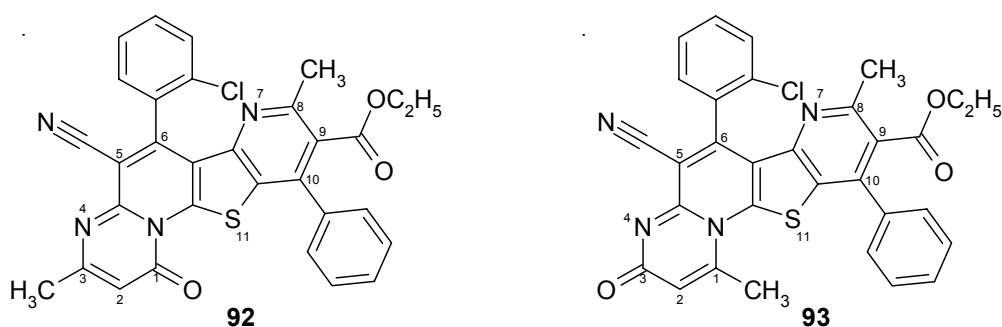


Abbildung 5-2: Die möglichen Isomere **92** und **93** der Pyrido[2'',3'':4',5']thieno[3',2':5,6]-pyrido[1,2-a]pyrimidine

Betrachtet man die Methylgruppe am C-3 des Isomers **92** bzw. C-1 des Isomers **93**, so sollten theoretisch jeweils ein Kreuzpeak für die Korrelation über zwei Bindungen zwischen den Protonen der Methylgruppe und dem Kohlenstoffatom C-3 bzw. C-1 und einer für die Korrelation über drei Bindungen zum tertiären C-2 zu sehen sein. Zusätzlich korrelieren die Protonen der Methylgruppe über vier Bindungen mit dem Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe (C-1 bzw. C-3) und dem C-4a. Ein zusätzlicher Kreuzpeak für eine Korrelation über vier Bindungen zum C-11a würde nur im Spektrum des Isomers **93** auftauchen und würde das Vorliegen dieser Struktur beweisen. Tritt es nicht auf, ist der Umkehrschluss, dass es sich um Isomer **92** handelt, allerdings nicht erlaubt.

Da im erhaltenen Spektrum für die Protonen der Methylgruppe nur zwei Kreuzpeaks zu einem tertiären und einem quartären Kohlenstoffatom aufgetaucht sind, die offensichtlich die Korrelation zum C-2 (tert.) und zum C-3 (Struktur **92**) bzw. C-1 (Struktur **93**) anzeigen, konnte eine Strukturaufklärung der vorliegenden Verbindung mit Hilfe des HMBC nicht erfolgen.

Eine Röntgenkristallstruktur-Analyse ergab schließlich, dass es sich bei der vorliegenden Substanz um das Isomer **92** handelt (Abbildung 5-3).

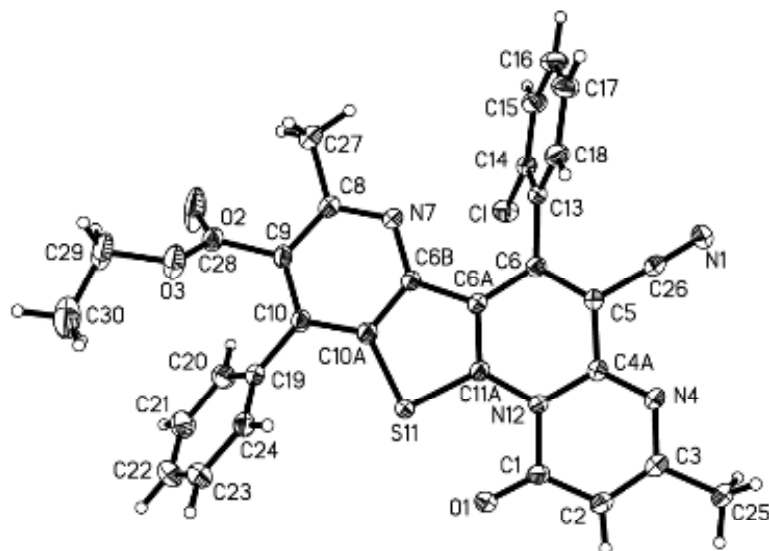


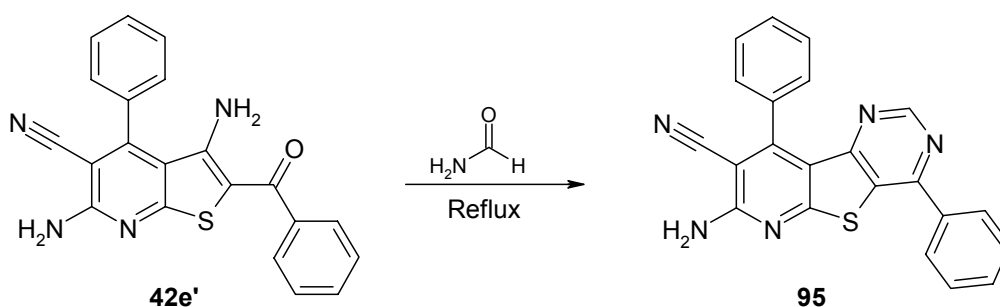
Abbildung 5-3: Röntgenkristallstruktur von **92**

(Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur)

In einem zweiten Versuch wurde versucht, **42u** unter den klassischen Bedingungen einer Friedländer-Synthese nach einer Vorschrift von Fehnel in Eisessig mit konzentrierter Schwefelsäure zum Produkt **88** umzusetzen (Schema 5-20, 2.).¹³² Es wurde ein Produktgemisch erhalten, aus dem keine Substanz isoliert werden konnte.

5.3.2.2 Reaktion mit Formamid

Ortho-Aminobenzophenone reagieren mit Formamid zu Pyrimidin-Derivaten.^{133,134} Bei den Verbindungen **42** ist eine ähnliche Struktur vorhanden, so dass theoretisch eine Zyklisierung mit Formamid möglich sein sollte (Schema 5-22). Allerdings können 2-Aminobenzonitrile durch Formamid ebenfalls zu Aminopyrimidin-Derivaten zyklisiert werden. Khoroshilov et al. gelang es, 2-Amino-3-aryloindolizin-1-carbonitril, in dem eine Nitrilgruppe, eine Aminogruppe und ein Arylrest benachbart sind, entweder durch Kochen in Formamid über die Aminogruppe und den Arylrest zum Arylpyrimidin zu zyklisieren oder durch Kochen in Formamid in Gegenwart von Acetanhydrid über die Amino- und die Nitrilgruppe zum Aminopyrimidin.¹³⁵ Zur Synthese der Verbindung **95** wurde dementsprechend die Ausgangsverbindung **42e'** in Formamid ohne weitere Zusätze zum Rückfluss erhitzt (Schema 5-22). Es wurde ein Produktgemisch erhalten, aus dem jedoch keine definierten Produkte isoliert werden konnten.

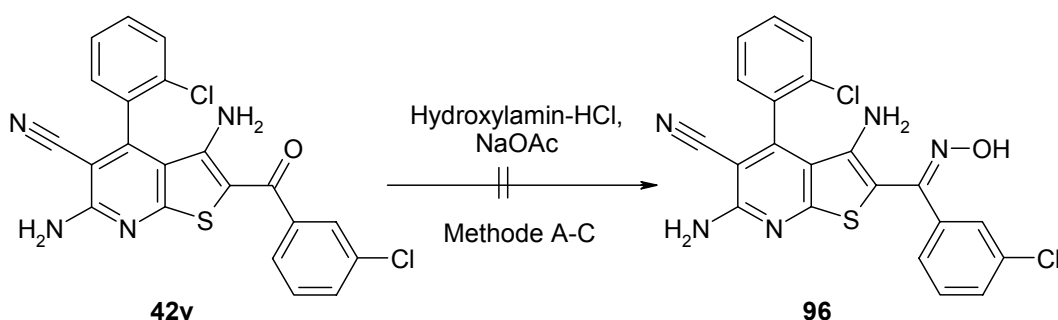


Schema 5-22: Angestrebte Umsetzung von **42e'** mit Formamid

5.4 Umwandlung des Ketons in ein Oxim

Die Oximgruppe ist bioisoster zur Ketogruppe und kann durch Reaktion eines Ketons mit Hydroxylamin eingeführt werden. Meist wird Hydroxylaminhydrochlorid eingesetzt, aus dem während der Reaktion durch Zugabe einer Base, wie zum Beispiel Natriumacetat, das freie Hydroxylamin entsteht.

Aus dem 2-Aroylthienopyridin **42v** sollte das entsprechende Oxim **96** durch Reaktion mit Hydroxylamin hergestellt werden (Schema 5-23). Dazu wurden verschiedene Lösungsmittel ausprobiert. Die Umsetzung des Ketons zum Oxim gelang in keinem der drei verwendeten Lösungsmittel Ethanol/Wasser^{136,137}, Eisessig¹³⁸ und Dimethylformamid¹³⁹. Da die Ketogruppe in **42v** mit der Aminogruppe in Position 3 ein vinyloges Amid bildet, ist die Reaktivität der Ketogruppe offensichtlich soweit herabgesetzt, dass die Reaktion nicht ablaufen konnte.

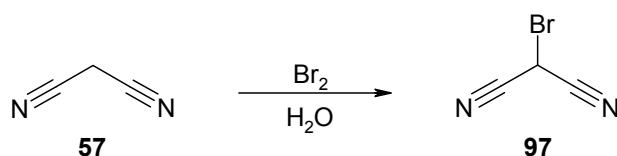


Schema 5-23: Versuch der Umsetzung zum Oxim (verschiedene Lösemittel: Methode A: Ethanol/Wasser, Methode B: Eisessig, Methode C: DMF)

5.5 Synthese der Pyrazolopyridine

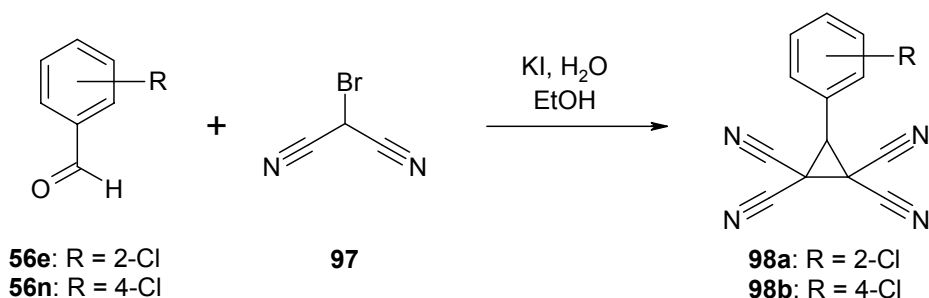
Takahashi et al. berichteten über die Darstellung von 2*H*-Pyrazolo[3,4-*b*]pyridinen aus Cyclopropan-1,1,2,2-tetracarbonitrilen und Phenylhydrazinen.¹⁴⁰ Diese Strukturen haben einen ähnlichen Grundkörper wie die Thienopyridine **42**, allerdings fehlt ihnen die Ketofunktion in der Seitenkette. Entsprechend der Thienopyridine wurden Derivate synthetisiert, die in Position 4 einen ortho-substituierten Phenylrest besitzen (**46a-b**) (Schema 5-26). Zusätzlich sollte das 3,6-Diamino-4-(4-chlorphenyl)-2-phenyl-2*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbonitril **46c**, das von Takahashi et al. bereits synthetisiert wurde, ebenfalls hergestellt werden, um einen Vergleich der analytischen Daten zu ermöglichen.

Zur Synthese der 2*H*-Pyrazolo[3,4-*b*]pyridine **46** wurde zunächst 2-Brommalonsäuredinitril **97** nach einer Vorschrift von Boldt et al. durch Zutropfen von Brom zu einer eisgekühlten Suspension von Malonsäuredinitril **57** in Wasser hergestellt (Schema 5-24).¹⁴¹ Die abgesaugten Kristalle wurden ohne weitere Aufarbeitung zur Synthese der Cyclopropan-1,1,2,2-tetracarbonitrile **98** eingesetzt.



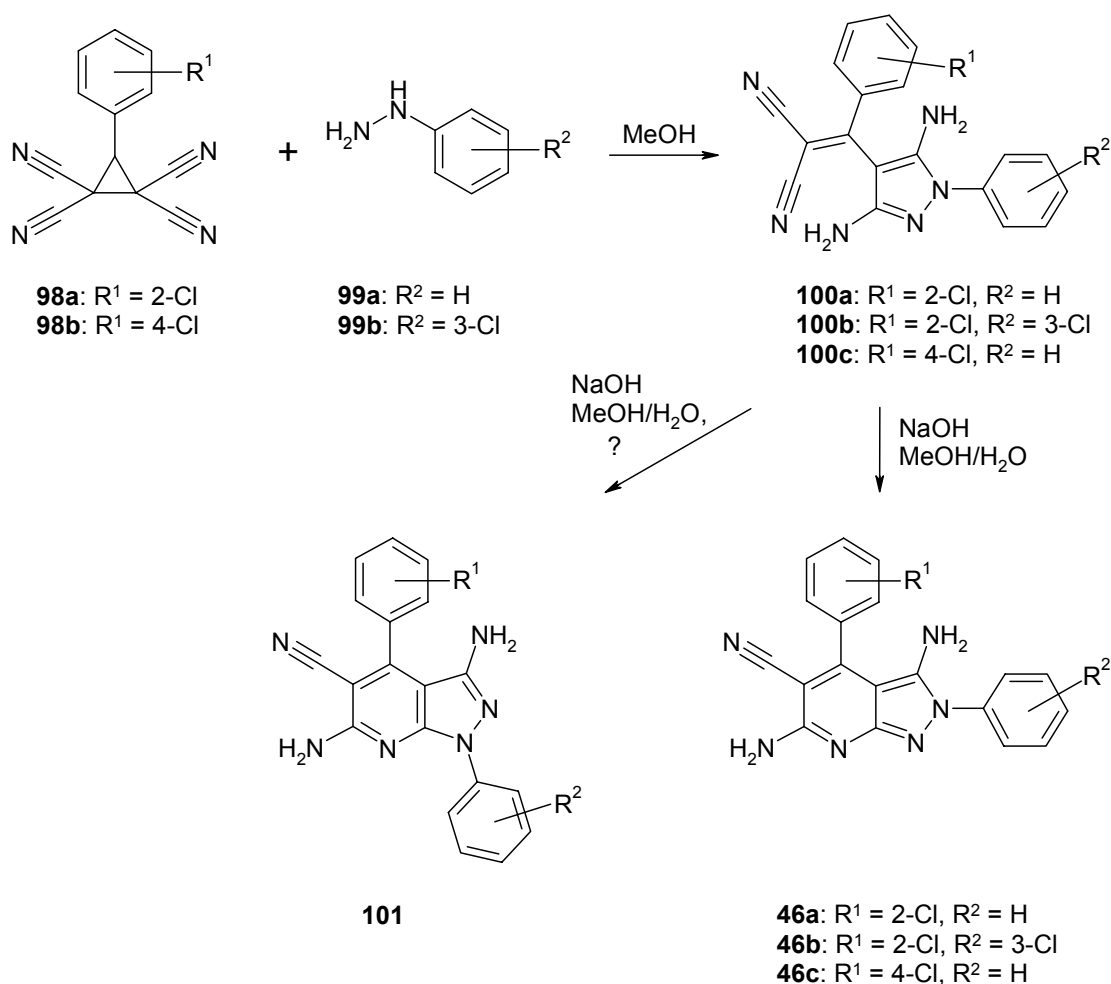
Schema 5-24: Synthese von 2-Brommalonsäuredinitril **97**

Die Cyclopropan-1,1,2,2-tetracarbonitrile **98** entstanden durch Reaktion aromatischer Aldehyde **56** mit zwei Äquivalenten 2-Brommalonsäuredinitril (**97**) und Iodid nach einer Vorschrift von Hart und Freeman (Schema 5-25).¹⁴² Diese Reaktion ist bekannt als die Wideqvist-Reaktion. Das 2-Brommalonsäuredinitril (**97**) dient dabei zusätzlich als Säure mit einem pKa-Wert ~ 5.¹⁴³



Schema 5-25: Wideqvist-Reaktion zur Synthese der Cyclopropan-tetracarbonitrile **98**

Die 2*H*-Pyrazolo[3,4-*b*]pyridine **46** sollten anschließend durch Reaktion der Cyclopropan-1,1,2,2-tetracarbonitrile **98** mit den Phenylhydrazinen **99a-b** hergestellt werden (Schema 5-26). Zunächst trat ein Zwischenprodukt auf, das sich durch eine karminrote Färbung auszeichnete. Diese Zwischenstufe wurde jedoch nicht isoliert, stattdessen wurde das Lösungsmittel Methanol aus dem Ansatz entfernt und der Rückstand direkt weiter in wässrigem Methanol mit Natriumhydroxid behandelt, um das Endprodukt zu erhalten. In Schema 5-26 ist der von Takahashi et al. postulierte Reaktionsmechanismus aufgeführt. Dabei kann theoretisch ausgehend von der Zwischenstufe **100** entweder die Aminogruppe in Position 3 oder die in Position 5 des Pyrazols an der Nitrilgruppe angreifen. Als Endprodukte sind nach Takahashi et al. also die Stellungsisomere **46** und **101** möglich.¹⁴⁰



Schema 5-26: Von Takahashi et al. postulierter Reaktionsmechanismus zur Synthese der 2*H*-Pyrazolo[3,4-*b*]pyridine¹⁴⁰

Durch diesen Syntheseweg konnten die gelb gefärbten Verbindungen **46a** und **46b** hergestellt werden. Die analytischen Daten dieser zwei Verbindungen waren sich sehr ähnlich, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich in beiden Fällen um dasselbe Stellungsisomer handelte. Im ^1H -NMR-Spektrum tauchten die Signale der beiden Aminogruppen bei 5.1-5.4 bzw. 6.6-6.8 ppm auf. Das UV-Spektrum zeigte in beiden Fällen Absorptionsmaxima bei 241 und 345 nm. Die Struktur der Verbindung **46a** konnte durch Röntgenkristallstruktur-Analyse eindeutig identifiziert werden (Abbildung 5-4).

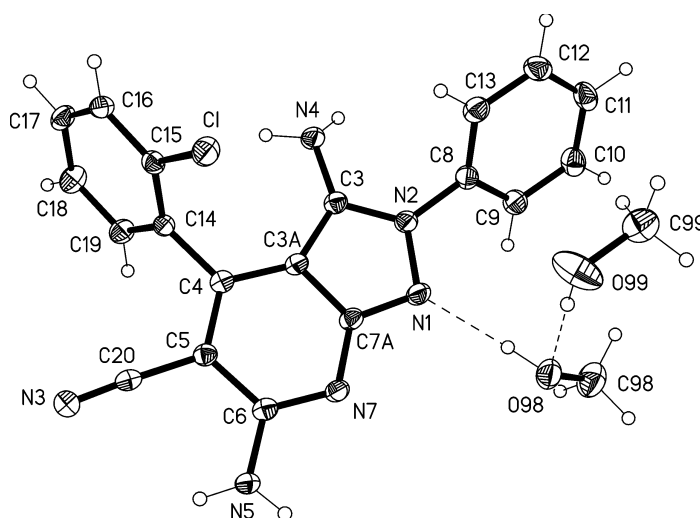


Abbildung 5-4: Röntgenkristallstruktur des Pyrazolopyridins **46a**

(Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur)

Bei der Reaktion von 3-(4-Chlorphenyl)cyclopropan-1,1,2,2-tetracarbonitril **98b** mit Phenylhydrazin wurde als Endprodukt wie von Takahashi et al. beschrieben die Verbindung **46c** erwartet.¹⁴⁰ Beim Vergleich der analytischen Daten des roten Endproduktes mit denen der Verbindungen **46a-b** fiel jedoch auf, dass die Signale der Protonen, die an Stickstoffatome gebunden sind, im ^1H -NMR-Spektrum deutlich ins tiefe Feld verschoben waren (8.11 bzw. 8.69 ppm). Es handelt sich um zwei breite Singulets, deren Intensität jeweils einem Proton entspricht. Takahashi et al. führten leider keine NMR-Daten der 2H-Pyrazolo[3,4-*b*]pyridine auf, mit denen diese Daten verglichen werden könnten.

Darüber hinaus zeigte die Verbindung ein anderes UV-Spektrum, bei dem die Absorptionsmaxima bei 252, 295 und 393 nm lagen.

Die Röntgenkristallstruktur-Analyse dieser Verbindung ergab, dass es sich nicht um das Stellungsisomer **101c**, sondern um die Azoverbindung **102** handelt (Abbildung 5-5).

Die Bindungslängen und -winkel der Azobindung stimmen mit den Literaturangaben für Azobenzole überein (Tabelle 5-5).¹⁴⁴

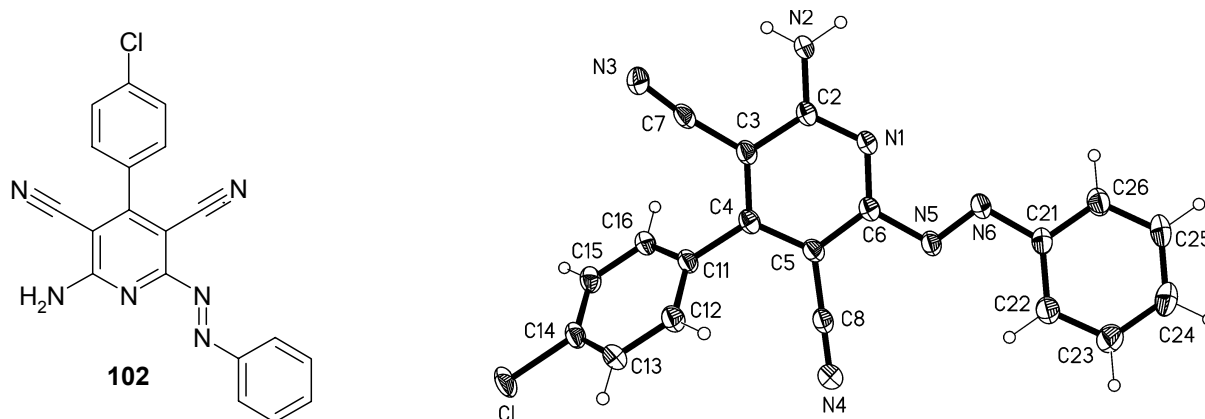
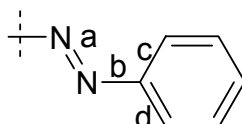


Abbildung 5-5: Röntgenkristallstruktur der Azoverbindung **102**

(Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur)

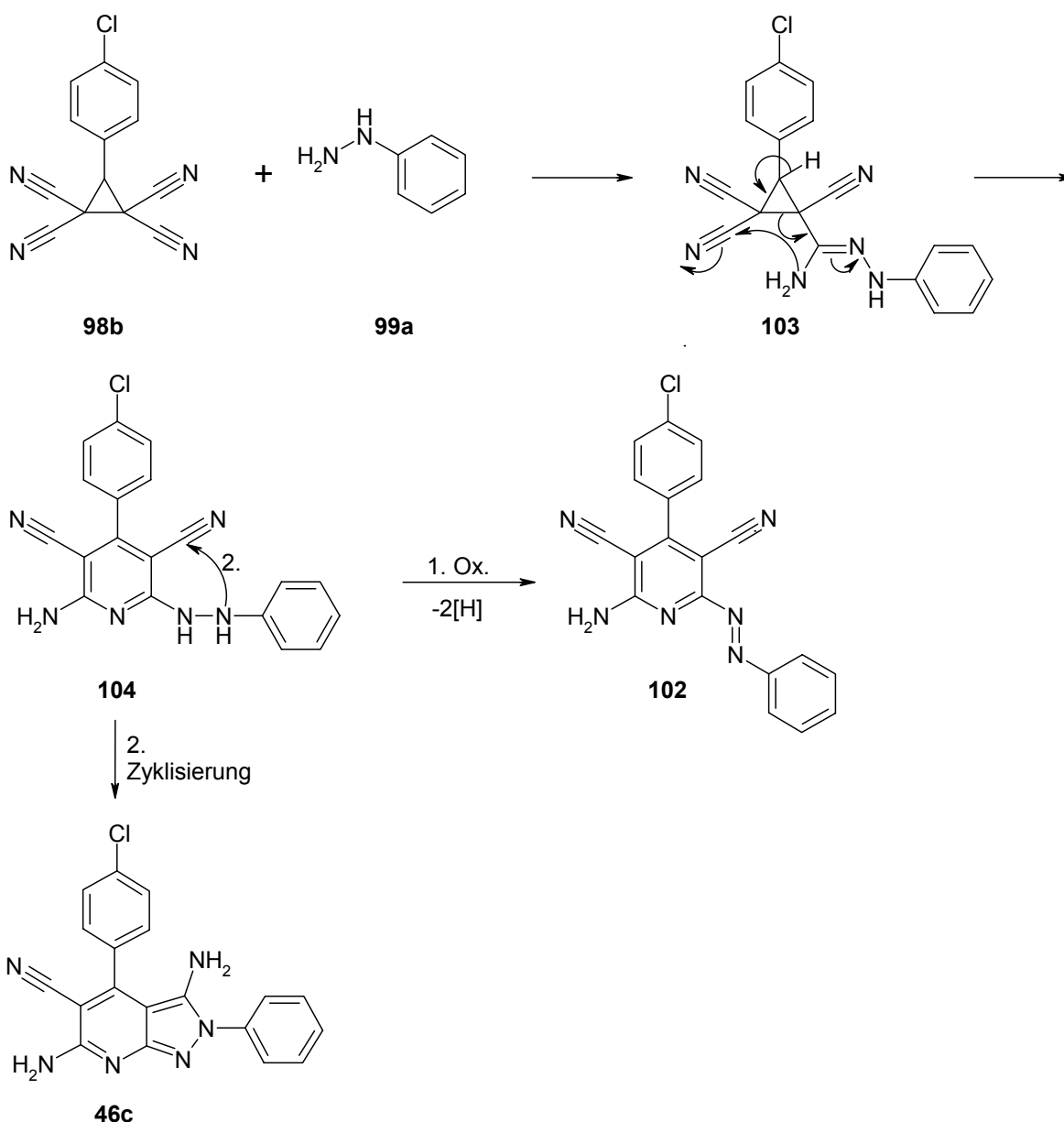
Tabelle 5-5: Bindungslängen und -winkel der Azobindung



Längen [Å]	gemessen	Literaturwert ¹⁴⁴
a	1.2580	1.25
b	1.4255	1.42
Winkel [°]	gemessen	Literaturwert ¹⁴⁴
ab	113.64	113
bc	124.36	125
bd	115.64	115

Ein möglicher Reaktionsmechanismus ist in Schema 5-27 abgebildet. Dabei reagieren das Cyclopropan-1,1,2,2,-tetracarbonitril **98b** und Phenylhydrazin (**99a**) zunächst zu Struktur **103**. Daraus bildet sich die Hydrazoverbindung **104**, die dann zur Azoverbindung **102** oxidiert wird.

Aus der Hydrazoverbindung **104** könnte durch nukleophilen Angriff der einen NH-Gruppe an der Nitrilgruppe auch das entsprechende Pyrazolopyridin **46c** entstehen (Schema 5-27). Da bei einigen Syntheseversuchen zur Herstellung der verschiedenen Pyrazolopyridine **46** nach dünnenschichtchromatographischer Kontrolle auch teilweise Produktgemische der beiden Strukturen **46** und **102** vorlagen, handelt es sich anscheinend um zwei Konkurrenzreaktionen ausgehend von der Hydrazoverbindung **104**.

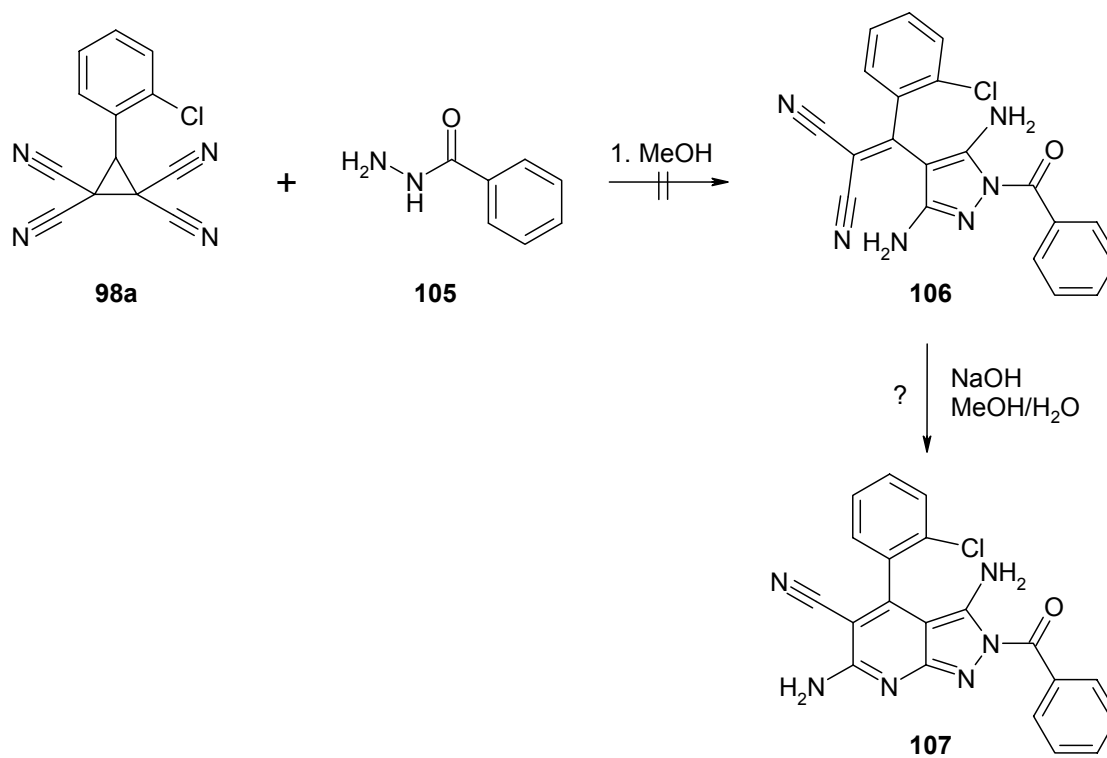


Schema 5-27: Möglicher Reaktionsmechanismus zur Darstellung der Azoverbindung **102** und Pyrazolopyridine **46**

Die Verbindung **102** wurde zusätzlich massenspektrometrisch untersucht. Dazu wurde zunächst ein Spektrum nach Elektronen-Ionisation aufgenommen. Im Massenspektrum trat sowohl ein Molpeak entsprechend einer Molekülmasse von 358 auf, der durch die Azoverbindung **102** hervorgerufen wurde, als auch ein solcher für ein Teilchen mit einer Molekülmasse von 360, der der Hydrazoverbindung **104** (vgl. Schema 5-27) entsprechen könnte. Daraufhin wurde ein zweites Massenspektrum nach Elektrospray-Ionisation aufgenommen. Der Basispeak trat hier bei $m/z = 381$ auf. Dieser entspricht dem Natrium-Addukt $[M+Na]^+$ von **102**. Außerdem ist noch ein $[2M+Na]^+$ -Peak bei $m/z = 739$ zu identifizieren. Entsprechende Peaks für Addukte mit einem Teilchen mit der Molekülmasse 360 fehlen. Es ist daher davon auszugehen, dass der Peak entsprechend einer Molekülmasse von 360 im EI-Massenspektrum durch ein Artefakt hervorgerufen wird, welches eventuell durch Hydrierung innerhalb des Massenspektrometers entstanden ist. Im EI-Massenspektrum tauchen zusätzlich typische Fragmente auf, die bei der Ionisation von Azoverbindungen entstehen, z.B. das Phenylkation bei $m/z = 77$ und das Phenyl-diazoniumkation bei $m/z = 105$, die das Vorhandensein der Verbindung **102** bestätigen.¹⁴⁴

Es lässt sich also ein alternativer Reaktionsmechanismus zur Darstellung der Pyrazolopyridine formulieren, bei dem im Gegensatz zu dem von Takahashi et al. beschriebenen Mechanismus über eine Pyrazol-Zwischenstufe **100** (Schema 5-26) zunächst der Pyridinring (vgl. Schema 5-27) ausgebildet wird.

Die Umsetzung des Cyclopropan-1,1,2,2,-tetracarbonitrils **98a** mit Benzhydrazid **105** würde in der Verbindung **107** resultieren, welche der Hit-Struktur **41** noch ähnlicher wäre als die oben beschriebenen 2*H*-Pyrazolo[3,4-*b*]pyridine **46**. Schema 5-28 zeigt den Reaktionsmechanismus analog zu dem in Schema 5-26 dargestellten von Takahashi et al. postulierten Mechanismus. Leider konnte die Verbindung **107** durch diese Synthese nicht dargestellt werden. Offensichtlich wird die Nukleophilie des Hydrazid-Stickstoffatoms durch die Nachbarschaft zur Carbonylgruppe soweit herabgesetzt, dass es nicht zur Zyklisierung zum Pyrazol kommen kann.



Schema 5-28: Versuch der Umsetzung zum 2-Benzoyl-2*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin **107**

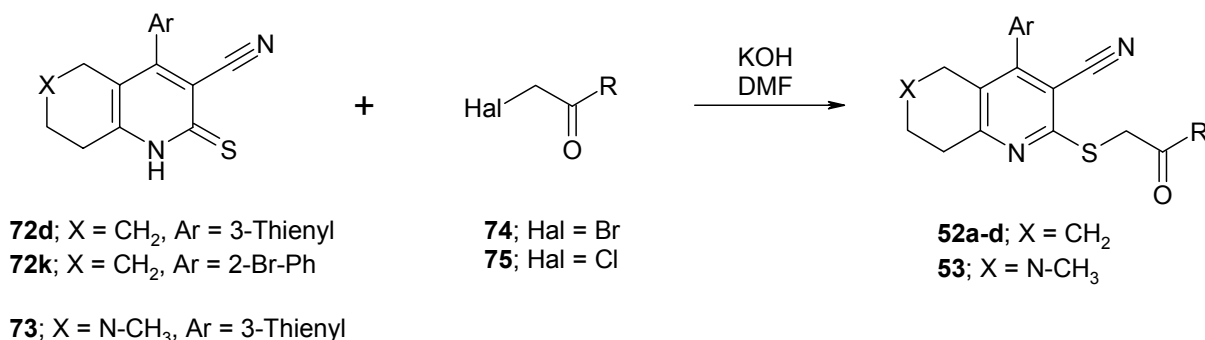
5.6 Synthese der Pyridin-3,5-dicarbonitrile, 5,6,7,8-Tetrahydrochinolin-3-carbonitrile und -naphthyridin-3-carbonitrile

Die allgemeine Synthese der Verbindungen mit der Struktur **48** durch Alkylierung der Thioxopyridine **62**, Thioxochinoline **72** und Thioxonaphthyridine **73** ist in Abschnitt 5.2.1 bereits erläutert worden (Schema 5-10). Die Verbindungen, die als RET-Inhibitoren synthetisiert wurden, können unter dem Aspekt der Synthese in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden, je nachdem, ob in der Seitenkette eine Ketogruppe vorhanden ist.

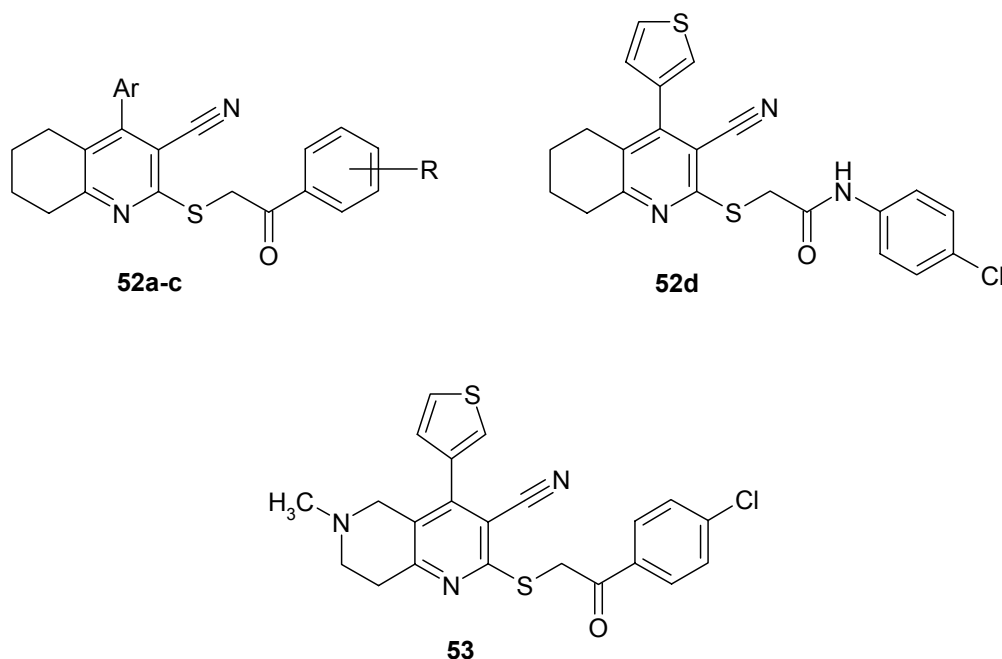
5.6.1 Verbindungen mit Ketogruppe in der Seitenkette

Die neuen Verbindungen **52**, **53** und **55** zeichnen sich durch eine Ketogruppe in β -Stellung zum Schwefel aus und bilden die eine Hauptgruppe. Diese Gruppe lässt sich wiederum unterteilen.

Einerseits wurden 5,6,7,8-Tetrahydrochinolin- bzw. -naphthyridinderivate **52** bzw. **53** aus Thioxochinolin- und Thioxonaphthyridin-Derivaten **72** und **73** hergestellt (Schema 5-29). Als Alkylierungsmittel wurden Phenacylbromide **74** bzw. 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)-acetamid **75** eingesetzt. In Tabelle 5-6 sind die synthetisierten Verbindungen aufgeführt. Verbindungen dieser Art sind literaturbekannt, allerdings befinden sich unter den beschriebenen Strukturen keine mit ortho-substituiertem Phenyl- oder 3-Thienyl-Rest in Position 4 des 5,6,7,8-Tetrahydrochinolin- bzw. naphthyridin-Grundkörpers.^{112,119,145}

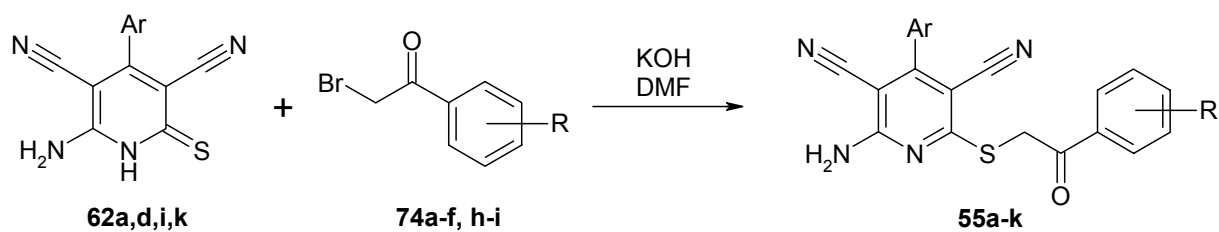


Schema 5-29: Synthese der Verbindungen **52** und **53** (Zur Bezeichnung von Ar und R vgl. Tabelle 5-6.)

Tabelle 5-6: Synthetisierte Verbindungen **52** und **53**

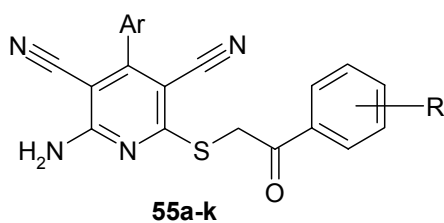
	Ar	R
52a	3-Thienyl	H
52b	3-Thienyl	4-Cl
52c	2-Br-Ph	H
52d	siehe oben	
53	siehe oben	

Andererseits wurden die Pyridinderivate **55** durch Umsetzung der Ausgangsverbindungen **62** mit Phenacylbromiden **74** dargestellt (Schema 5-30). Tabelle 5-7 gibt eine Übersicht über die synthetisierten Verbindungen **55a-k**. Ähnliche Strukturen wurden von Dyachenko und Mitarbeitern veröffentlicht.^{100,103,108,116,117} Darunter befanden sich keine Verbindungen mit 2-Bromphenylrest oder 3-Thienylrest in Position 4 des Pyridin-Grundkörpers. Die Verbindung **55a** wurde bereits von Krivokolysko et al. beschrieben.¹¹⁶



Schema 5-30: Synthese der Verbindungen **55** (Zur Bezeichnung der Reste Ar und R vgl. Tabelle 5-7.)

Tabelle 5-7: Synthetisierte Verbindungen **55a-k**



	Ar	R
55a	Ph	H
55b	2-Br-Ph	H
55c	4-Br-Ph	H
55d	4-Br-Ph	3,4-Cl
55e	3-Thienyl	H
55f	3-Thienyl	4-Cl
55g	3-Thienyl	4-OCH ₃
55h	3-Thienyl	4-CH ₃
55i	3-Thienyl	4-CN
55j	3-Thienyl	4-CF ₃
55k	3-Thienyl	3-Cl

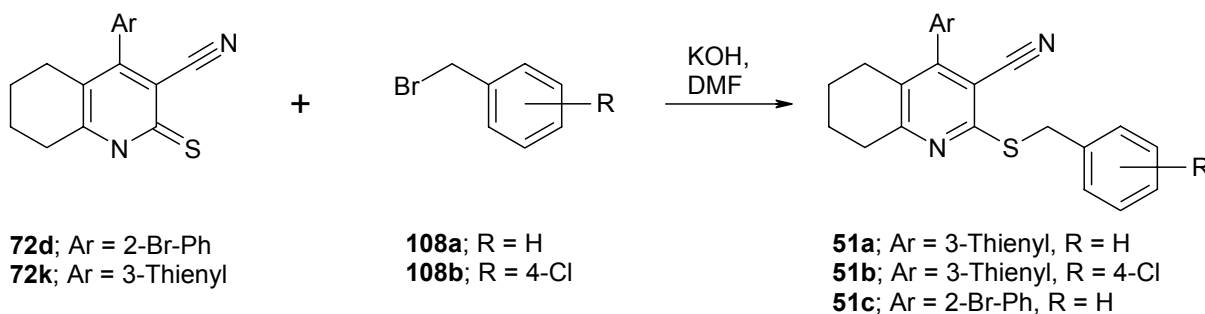
Bei der Alkylierung der Edukte **62**, **72** und **73** musste ein Überschuss an Kaliumhydroxid unbedingt vermieden werden, da sonst die gewünschten Verbindungen **52**, **53** und **55** unter Bildung der Thienopyridine in einer Thorpe-Ziegler-Reaktion reagiert hätten (vgl. Abschnitt 5.2.1).

5.6.2 Verbindungen ohne Ketogruppe in der Seitenkette

Die Verbindungen, die die zweite Hauptgruppe bilden (**51** und **54**), besitzen keine Ketofunktion im Rest an Position 2 des Pyridin- bzw. Tetrahydrochinolin-Grundgerüsts. Bei der Synthese dieser Substanzen ist ein Überschuss an Kaliumhydroxid daher nicht als kritisch anzusehen, da die Methylengruppe nicht durch einen elektronenziehenden Rest aktiviert ist und eine Thorpe-Ziegler-Reaktion somit nicht möglich ist.

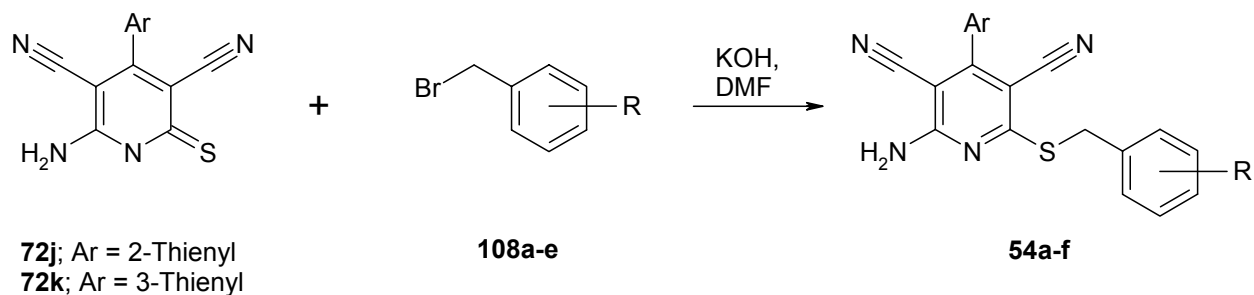
Auch hier kann man wieder zwei Untergruppen definieren, je nachdem, welche Edukte eingesetzt wurden.

Die Tetrahydrochinolinderivate **51a-c** entstehen durch Umsetzung der Ausgangsverbindungen **72d** und **72k** mit den Benzylbromiden **108a-b** (Schema 5-31). Verbindungen dieser Art sind bereits von Dyachenko et al. und Awad et al. beschrieben worden, darunter befanden sich jedoch keine Strukturen mit ortho-substituiertem Phenyl- oder 3-Thienyl-Rest.^{119,146}



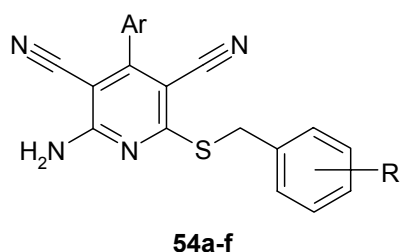
Schema 5-31: Synthese der Tetrahydrochinolinderivate **51**

Zur Synthese der Pyridinderivate **54a-f** werden die Thioxopyridine **62j-k** mit den Benzylbromiden **108a-e** mit Kaliumhydroxid in Dimethylformamid umgesetzt (Schema 5-32). Eine Übersicht der synthetisierten Verbindungen **54** ist in Tabelle 5-8 dargestellt. Sehr viele dieser Verbindungen sind bereits in der Literatur beschrieben worden, das erste Mal wurden sie von Dyachenko et al. erwähnt.^{117,147}



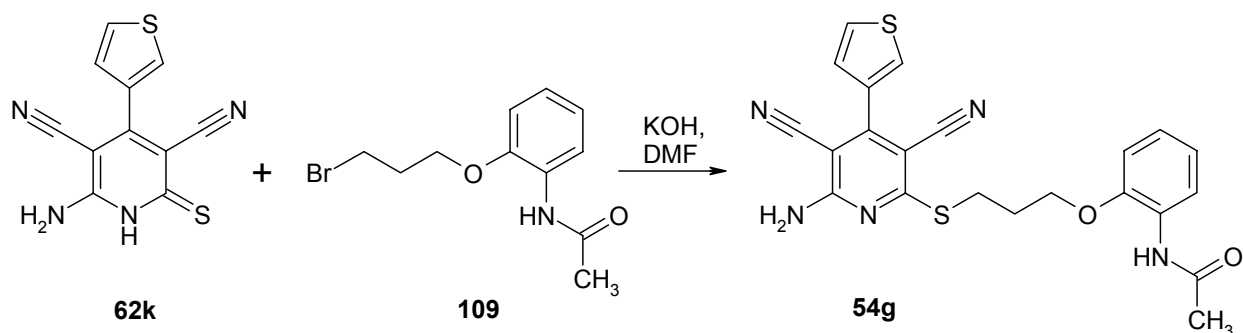
Schema 5-32: Synthese der Pyridinderivate **54** (Zur Bezeichnung der Reste Ar und R vgl. Tabelle 5-8.)

Tabelle 5-8: Synthetisierte Verbindungen **54a-f**



	Ar	R
54a	3-Thienyl	H
54b	3-Thienyl	4-Cl
54c	3-Thienyl	4-OCH ₃
54d	3-Thienyl	4-CH ₃
54e	3-Thienyl	3,4-Cl
54f	2-Thienyl	4-OCH ₃

In diese Gruppe der Pyridinderivate ohne Ketofunktion in der Seitenkette kann auch die Verbindung **54g** eingeordnet werden, die durch die Umsetzung des Thioxopyridins **62k** mit *N*-[2-(3-Brompropoxy)phenyl]acetamid **109** unter Zusatz von Kaliumhydroxid in Dimethylformamid synthetisiert wurde (Schema 5-33). Das *N*-[2-(3-Brompropoxy)phenyl]acetamid **109** wurde nach einer Vorschrift von Möllenbeck aus *N*-(2-Hydroxyphenyl)acetamid und 1,3-Dibrompropan mit Kaliumcarbonat in Aceton hergestellt.¹⁴⁸



Schema 5-33: Synthese der Verbindung **54g**

5.6.3 Besonderheiten in der ^1H -NMR-Analytik

Die oben genannten, offenkettigen Verbindungen **51-55**, bei denen eine Bildung des Thiophenrings nicht an die Alkylierung angeschlossen wurde, verfügen im Bereich von 4.5 bis 5.0 ppm über ein Signal oder mehrere Signale für die Methylengruppe in der Seitenkette. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um ein Singulett. Bei den Verbindungen, die in Position 4 des Pyridin- bzw. Chinolin-Grundkörpers einen Phenylrest mit einem Bromsubstituenten in ortho-Stellung besitzen, spalten die Protonen der Methylengruppe jedoch auf. Bei den Verbindungen **51c** und **52c** sind zwei Dubletts mit einer Kopplungskonstante von $J = 13.6$ bzw. 16.8 Hz zu sehen, die ein AB-System bilden. Durch den relativ großen Brom-Substituenten in ortho-Stellung ist die Drehbarkeit des Phenylrestes eingeschränkt, so dass **51c** und **52c** Atropisomere bilden und daher chiral sind. Aus diesem Grund werden die Protonen der Methylengruppe diastereotop und ergeben nicht isochrone, miteinander koppelnde Signale.

In Abbildung 5-6 sind die ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen **45c**, **52c** und **52b** als Beispiele vergleichend aufgeführt. Im Bereich zwischen 7.2 und 8.2 ppm sind jeweils die Signale der aromatischen Protonen zu sehen. Im höheren Feld erscheinen die Signale der Aminogruppe bei **45c** (oben), die beiden Dubletts der Methylengruppe bei **52c** (Mitte) und das Singulett der Methylengruppe bei **52b** (unten).

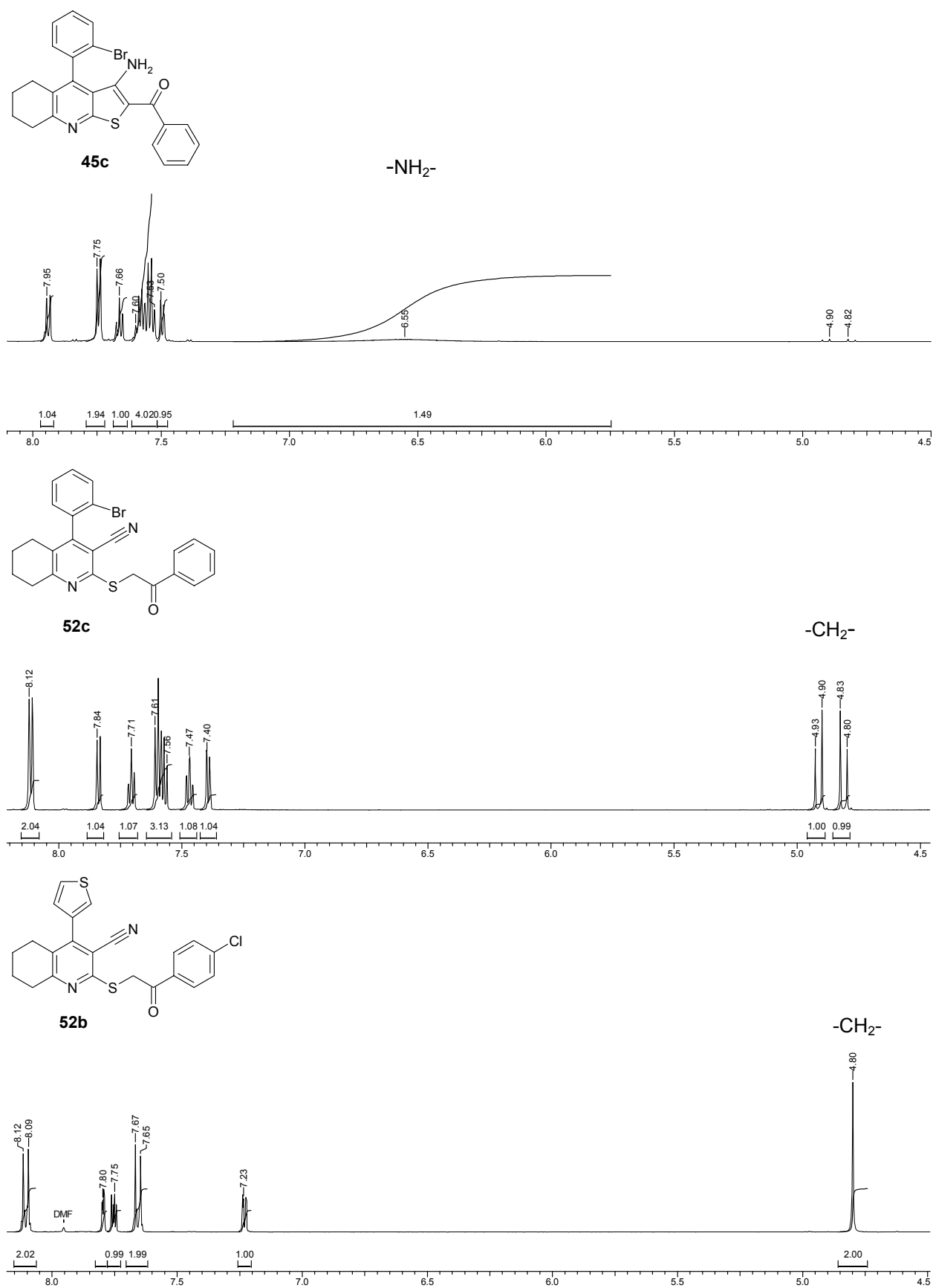


Abbildung 5-6: Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen **45c** (oben), **52c** (Mitte) und **52b** (unten), Lösungsmittel: $\text{DMSO-}d_6$

6 Biologische Aktivität

6.1 *Pf*GSK-3 und Säugetier-GSK-3

6.1.1 Allgemeine Betrachtungen zur Inhibition der Kinaseaktivität durch Thienopyridine

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, Verbindungen zu synthetisieren, die einen inhibitorischen Effekt auf die Kinaseaktivität der plasmodialen GSK-3 haben, ohne die humane GSK-3 zu hemmen. Die Verbindungen sollen also eine deutliche Selektivität für *Pf*GSK-3 zeigen. Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Thienopyridine und Pyrazolopyridine wurden in einem Kinase-Assay unter Verwendung von radioaktiv markiertem ATP auf ihre inhibitorische Wirkung an isolierter *Pf*GSK-3 und GSK-3 in den Laboratorien von Laurent Meijer (Station Biologique de Roscoff, Frankreich) untersucht. Die IC_{50} -Werte wurden durch Messung der Kinaseaktivität unter Einfluss acht bis neun verschiedener Konzentrationen an Inhibitor bestimmt. Die Konzentrationen rangierten dabei meist zwischen 0.005 und 10 μ M, in einigen Fällen bis 100 μ M. Im Folgenden wird die Kinase-inhibitorische Aktivität der verschiedenen Verbindungen durch Vergleiche der IC_{50} -Werte an *Pf*GSK-3 und GSK-3 beschrieben. Der pIC_{50} -Wert stellt in diesem Zusammenhang den negativen dekadischen Logarithmus des IC_{50} -Wertes dar. In der Darstellung als Säulendiagramm repräsentieren höhere Balken demnach Verbindungen mit höherer inhibitorischer Aktivität.

Die Hit-Struktur **41** wurde im Rahmen dieser Arbeit erneut synthetisiert und getestet. Die inhibitorische Aktivität war mit einem IC_{50} -Wert von 1.6 μ M ein wenig geringer, als bei den ersten Testungen im Zuge des Hochdurchsatz-Screenings (0.43 μ M). Bei der Bewertung der inhibitorischen Aktivität der neuen Verbindungen **42** wurde als Vergleich der IC_{50} der zweiten getesteten Charge **41** (1.6 μ M) herangezogen, da dieser Wert aus einer analog durchgeführten und damit direkt vergleichbaren Messung resultierte.

Die Thienopyridin-2-carboxamide **43**, Thienochinoline **45** und die Pyrazolopyridine **46** zeigten weder an *Pf*GSK-3 noch an GSK-3 bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M eine Hemmung der Enzymaktivität. Die inhibitorische Wirkung der Aroylthienopyridine **42** sowie

der Hit-Struktur **41** und der Thienopyridin-2-carbonitrile **44** werden in den folgenden Abschnitten im Einzelnen diskutiert. Dabei werden beispielhaft die IC_{50} -Werte einiger Verbindungen unter bestimmten Gesichtspunkten betrachtet und verglichen. Eine vollständige Auflistung der IC_{50} -Werte aller Verbindungen an *Pf*GSK-3 und GSK-3 ist im biologischen experimentellen Teil aufgeführt (Abschnitt 9.3.1).

6.1.2 Kinase-inhibitorische Aktivität der 2-Aroylthienopyridine

Durch die Testungen an den beiden Kinasen konnten einige selektive *Pf*GSK-3-Inhibitoren unter den synthetisierten Verbindungen identifiziert werden. Diese sind ausschließlich Vertreter der 2-Aroylthienopyridine **42**. Alle Verbindungen **42**, die eine inhibitorische Aktivität an *Pf*GSK-3 aufweisen, verfügen gleichzeitig auch über eine deutliche Selektivität für diese Kinase gegenüber Säuger-GSK-3. Verwunderlich ist jedoch, dass andererseits viele strukturell sehr ähnliche Vertreter dieser Verbindungsklasse keine inhibitorische Wirkung an *Pf*GSK-3 zeigten. Einige Strukturmerkmale scheinen sich jedoch günstig auf die Aktivität der Verbindungen auszuwirken. Diese Zusammenhänge werden im Folgenden diskutiert.

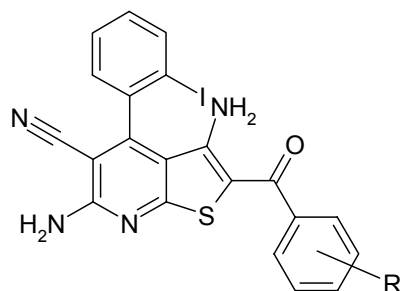
Substitution des Benzoylringes vergleichend zur Hit-Struktur **41**

Die Hit-Struktur **41** trägt am 2-Benzoylrest des Thienopyridin-Grundgerüsts einen Chlorsubstituenten in para-Stellung. Dieser Substituent wurde durch verschiedene Substituenten ersetzt (H, 4-OCH₃, 4-CH₃, 4-CF₃).

Viele Vertreter aus dieser Reihe zeigten eine inhibitorische Aktivität an *Pf*GSK-3, jedoch war die Hemmwirkung bei keinem stärker als bei der Hit-Struktur (vgl. Tabelle 6-1).

Zusätzlich wurden Chlorsubstituenten in meta- und ortho-Stellung (Verbindungen **42m** und **42n**), sowie in meta-/para-Stellung (**42o**) des 2-Benzoylrestes eingeführt. In den Testungen zeigte sich Verbindung **42m** als stärkerer Inhibitor (IC_{50} -Wert von 0.91 μ M) als die Hit-Struktur. Eine meta-Substitution des Benzoylrestes wirkt sich offenbar günstig auf die inhibitorische Aktivität der Thienopyridine aus.

Tabelle 6-1: Unterschiedliche Substitution des 2-Benzoylrestes



Verbindung	R	IC ₅₀ (<i>Pf</i> GSK-3) [μM]	IC ₅₀ (GSK-3) [μM]
41	4-Cl	1.6	>10
42i	H	2.4	>10
42j	4-OCH ₃	1.7	>10
42k	4-CH ₃	3.2	>10
42l	4-CF ₃	>10	>10
42m	3-Cl	0.91	>10
42n	2-Cl	>10	>10
42o	3,4-Cl	>10 (≈70)	>100

Rolle und Größe des ortho-Substituenten des 4-Phenylrestes

Des Weiteren wurde auch verschiedene Thienopyridine **42** mit anderen Halogensubstituenten bzw. Methoxy- und Ethoxysubstituenten in ortho-Stellung des Phenylrings in Position 4 und verschiedener Substitution des Benzoylrestes in Position 2 synthetisiert. Eine ortho-Substitution des Phenylringes erscheint wichtig, da eine Struktur, die hier unsubstituiert ist (**42g'**, Abbildung 6-1) im Hochdurchsatz-Screening keine inhibitorische Wirkung aufwies.

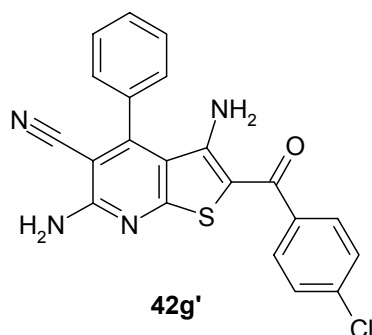
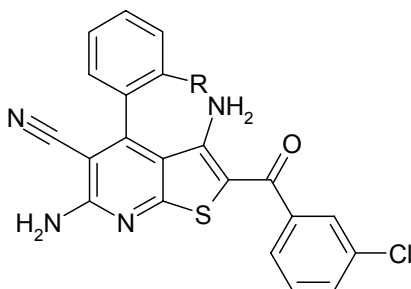


Abbildung 6-1: Verbindung **42g'**

Andererseits wirkt sich ein zu großer ortho-Substituent offenbar als ungünstig aus. Bis auf zwei Derivate (**42a** und **42f**) zeigten alle Derivate, die einen ortho-Methoxysubstituenten besitzen, bis zu einer Konzentration von 10 μM keine inhibitorische Aktivität an *Pf*GSK-3. Auch die Verbindung **42p** mit einem ortho-Ethoxysubstituenten wies keine Hemmwirkung an den beiden getesteten Kinasen auf. Vergleicht man eine Reihe von Thienopyridinen, die sich nur in der ortho-Substitution des 4-Phenylrestes unterscheiden, so schneidet der Chlorsubstituent am besten ab (vgl. Tabelle 6-2).

Tabelle 6-2: Verschiedene ortho-Substitutionen des 4-Phenylrestes bei meta-Chlor-substitution des Benzoylrestes



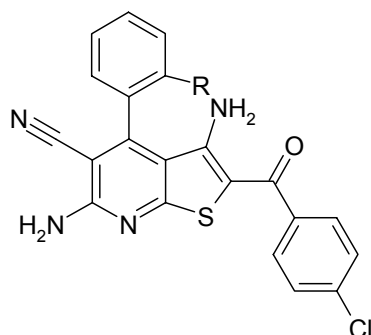
Verbindung	R	IC ₅₀ (<i>Pf</i> GSK-3) [μM]	IC ₅₀ (GSK-3) [μM]
42f	OCH ₃	8.5	>100
42m	I	0.91	>10
42s	Br	0.61	>10
42v	Cl	0.48, 0.06*	>10
42c'	F	10	>100

*Werte aus zwei Testreihen.

Zieht man allein die Größe des Substituenten in die Betrachtungen ein, müßte das Derivat mit dem ortho-Fluorsubstituenten (**42c'**) noch eine stärkere hemmende Wirkung haben. Diese Verbindung hat jedoch mit einem IC_{50} -Wert von 10 μM in dieser Reihe die schwächste inhibitorische Wirkung. Fluor hat einen sehr kleinen Radius und eine hohe Elektronegativität. Durch Einführen eines Fluorsubstituenten anstelle eines anderen Halogens können möglicherweise hydrophobe Wechselwirkungen zum Zielprotein nicht mehr ausgebildet werden, wodurch die inhibitorische Aktivität abgeschwächt wird.

Betrachtet man hingegen verschiedene ortho-Substituenten bei Vorhandensein eines Chlorsubstituenten in para-Stellung des Benzoylrestes (Tabelle 6-3), so fällt auf, dass die Verbindung **42r** mit dem kleineren Bromsubstituenten in ortho-Stellung im Gegensatz zur Hit-Struktur **41** keine inhibitorische Aktivität aufzeigt. Die Tatsache, dass kleinere ortho-Substituenten günstig sind, gilt offenbar nicht uneingeschränkt.

Tabelle 6-3: Verschiedene ortho-Substitutionen des 4-Phenylrestes bei para-Chlor-substitution des Benzoylrestes



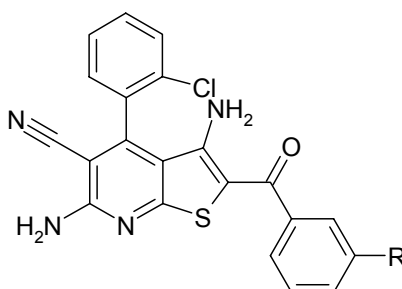
Verbindung	R	IC_{50} (PfGSK-3) [μM]	IC_{50} (GSK-3) [μM]
42b	OCH ₃	>10	>10
41	I	1.6	>10
42p	OC ₂ H ₅	>10	>10
42r	Br	>100	>100

Die Verbindung **42f'** mit einem 2-Thienylrest in Position 4 verfügt nicht über eine Hemmwirkung an *Pf*GSK-3. Das entsprechende Thienopyridin-2-carbonitril **44g** zeigt dagegen gute Aktivität, wenn auch bei fehlender Selektivität (siehe Abschnitt 6.1.3).

Unterschiedliche meta-Substituenten des Benzoylrestes

Aus den Ausführungen in den oberen Abschnitten lässt sich folgern, dass sich einerseits ein ortho-Chlorsubstituent des 4-Phenylringes günstig auf die biologische Aktivität auswirkt, andererseits auch ein meta-Chlorsubstituent des 2-Benzoylrestes. Die Kombination dieser beiden Strukturmerkmale führte zu einem IC₅₀-Wert von 0.48 µM an *Pf*GSK-3 (Verbindung **42v**). Eine erneute Untersuchung ergab sogar einen IC₅₀-Wert von 60 nM. Um zu überprüfen, ob auch andere Substituenten in meta-Stellung des 2-Benzoylrestes toleriert werden oder sogar eine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität mit sich bringen, wurden je nach kommerzieller Verfügbarkeit der einzusetzenden Phenacylhalogenide verschiedene Reste an dieser Stelle eingefügt (Tabelle 6-4).

Tabelle 6-4: Verschiedene meta-Substituenten im 2-Benzoylrest



Verbindung	R	IC ₅₀ (<i>Pf</i> GSK-3) [µM]	IC ₅₀ (GSK-3) [µM]
42v	Cl	0.48, 0.06*	>10
42x	OCH ₃	1.7	>10
42y	CF ₃	2.2	>10
42z	CN	0.5	>10
42a'	Br	0.91	>10
42b'	F	>100	>100

*Werte aus zwei Testreihen.

Alle synthetisierten Verbindungen in dieser Reihe verfügten über eine inhibitorische Aktivität an *Pf*GSK-3 mit IC₅₀-Werten im niedrigmikromolaren bzw. nanomolaren Bereich. Eine Ausnahme bildet wiederum die Verbindung mit einem Fluorsubstituenten.

Wie aus Tabelle 6-4 hervorgeht, konnte durch die Einführung unterschiedlicher Substituenten in meta-Stellung des 2-Benzoylrestes keine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität im Vergleich zu Verbindung **42v** erreicht werden.

Inhibitorische Aktivität der Verbindung **42d'**

Bei allen Verbindungen **42** mit zwei unterschiedlichen Substituenten in den ortho-Positionen des 4-Arylrestes ist aufgrund der eingeschränkten Drehbarkeit um die Einfachbindung zwischen den aromatischen Systemen mit dem Auftreten von Atropisomeren zu rechnen. Diese Verbindungen wurden als Racemate getestet.

Im Gegensatz dazu bildet die Verbindung **42d'** aufgrund identischer ortho-Substitution keine Atropisomere. An *Pf*GSK-3 wies sie einen IC₅₀-Wert von 2.2 µM auf, die Aktivität der Säugetier-GSK-3 wurde nicht beeinflusst. Die Verbindung **42d'** zeigte also vergleichbare Aktivität und Selektivität wie viele andere 2-Aroylthienopyridine **42**. Vergleicht man sie jedoch direkt mit der entsprechenden im 4-Phenylrest einfach substituierten Verbindung **42v** (IC₅₀ = 0.48/0.06 µM), ergibt sich eine ungefähr um den Faktor 5 bzw. 40 schwächere Hemmwirkung der *Pf*GSK-3.

6.1.3 Kinase-inhibitorische Aktivität der Thienopyridin-2-carbonitrile

Die Thienopyridin-2-carbonitrile **44a-h** sowie das kommerziell erworbene **44i**, das in Position 4 des Thienopyridin-Grundgerüsts unsubstituiert ist, wurden auf ihre Hemmwirkung an *Pf*GSK-3 und GSK-3 getestet.

Die inhibitorische Aktivität ist in Abbildung 6-2 durch die pIC₅₀-Werte dargestellt.

Wie bei den 2-Aroylthienopyridinen zeigen auch die Verbindungen **44** ein unterschiedliches Verhalten, obwohl sie sich strukturell untereinander sehr ähnlich sind. Einige weisen keine inhibitorische Wirkung auf. Hierbei fällt auf, dass es sich dabei meist um Verbindungen handelt, die in ortho-Position des 4-Phenylrings mit Ethoxy (**44e**), Methoxy (**44a**) und Iod (**44b**) einen vergleichsweise großen Substituenten tragen. Wie bei den 2-Aroylthienopyridinen **42** wird offensichtlich ein zu großer ortho-Substituent nicht toleriert.

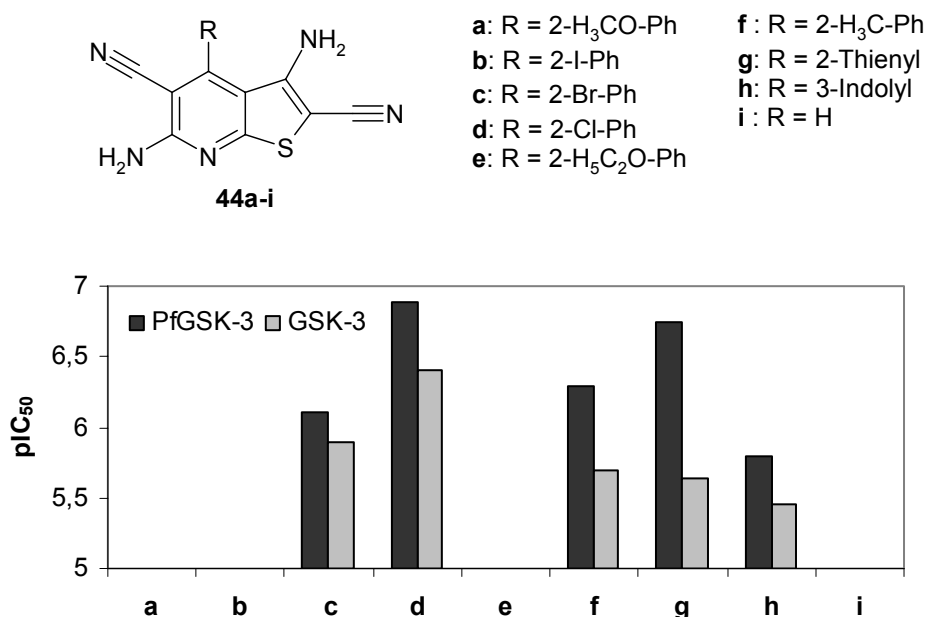
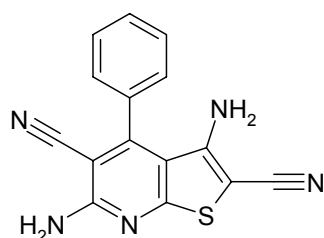


Abbildung 6-2: Inhibition von *Pf*GSK-3 und GSK-3 durch Thienopyridin-2-carbonitrile **44**

Die Verbindung **44i**, die in Position 4 des Thienopyridin-Grundgerüsts unsubstituiert ist, zeigt ebenfalls keinerlei Aktivitätsminderung an *Pf*GSK-3 oder GSK-3. Ein aromatischer Rest in Position 4 ist dementsprechend für die inhibitorische Aktivität notwendig.

Im Gegensatz zu den 2-Aroylthienopyridinen **42** ist ein ortho-Substituent des 4-Phenylrings jedoch bei den Verbindungen **44** offensichtlich nicht essentiell für die inhibitorische Wirkung, da das 3,6-Diamino-4-phenylthieno[2,3-*b*]pyridin-3,5-dicarbonitril (**44j**) im Hochdurchsatz-Screening einen IC₅₀-Wert von 400 nM an *Pf*GSK-3 zeigte (Abbildung 6-3).



44j

IC₅₀ (*Pf*GSK-3) = 0.4 μM

IC₅₀ (GSK-3) = 2.5 μM

Abbildung 6-3: Verbindung **44j**

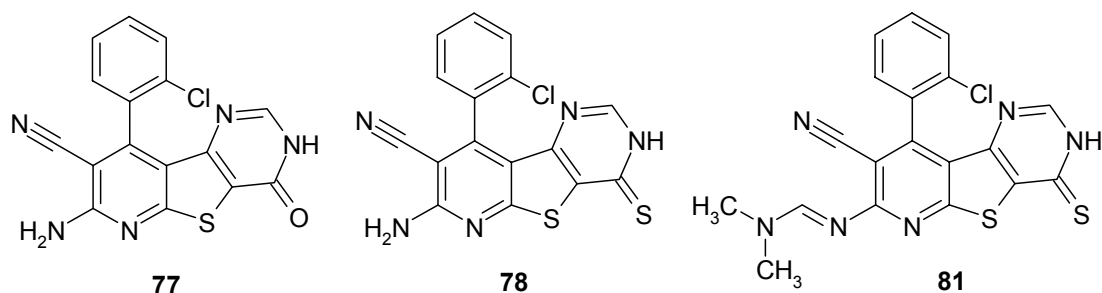
Die synthetisierten Thienopyridin-2-carbonitrile **44 c-d** und **f-g** verfügen über pIC_{50} -Werte >6 , das entspricht IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich. Die Verbindung **44h** hat einen IC_{50} -Wert von 1.6 ($pIC_{50} = 5.8$). Diese Thienopyridin-2-carbonitrile zeigten allerdings wie auch die Verbindung **44j** gegenüber Säuger-GSK-3 eine hemmende Wirkung mit IC_{50} -Werten im niedrigmikromolaren bis nanomolaren Bereich, sie verfügen also nicht über eine ausgeprägte Selektivität für *Pf*GSK-3 und sind aus diesem Grund als potentielle Wirkstoffe in der Malariatherapie ungeeignet.

Das Derivat **44d** hemmte aus der Substanzgruppe der Thienopyridin-2-carbonitrile **44** die *Pf*GSK-3 mit einem IC_{50} -Wert von 130 nM ($pIC_{50} = 6.9$) am stärksten. Von dieser Verbindung ist ein Cokristallisat mit humaner GSK-3 hergestellt und röntgenanalytisch untersucht worden (Anselm Oberholzer, Universität Bern und Laurent Meijer, Station Biologique, Roscoff; persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse werden in Abschnitt 6.1.5 im Zusammenhang mit der Diskussion über mögliche Bindungsmodi aufgeführt.

6.1.4 Sonstige

Neben den oben angeführten Substanzgruppen der 2-Aroylthienopyridine **42**, Thienopyridin-2-carboxamide **43**, Thienopyridin-2-carbonitrile **44**, Tetrahydrothienochinoline **45** und Pyrazolopyridine **46** wurden zusätzlich einige Abkömmlinge aus den durchgeführten Reaktionen von 3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44d**) (vgl. Abschnitt 5.3.1) auf ihre hemmende Wirkung auf *Pf*GSK-3 und GSK-3 getestet. Die getesteten Verbindungen **77**, **78** und **81** und die ermittelten IC_{50} -Werte sind in Abbildung 6-4 dargestellt.

Von **77** und **81** wurden lediglich Übersichtstestungen bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M angefertigt. Sie zeigten keine nennenswerte biologische Aktivität an plasmodialer oder Säugetier-GSK-3. Für das 4-Oxo-3,4-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin **77** ergab sich eine Restaktivität der *Pf*GSK-3 von ca. 50%, das entspricht einem IC_{50} -Wert von ca. 10 μ M. Das Amidin **81** zeigte weder am *Pf*GSK-3 noch an GSK-3 eine hemmende Wirkung.



IC_{50} (<i>Pf</i> GSK-3) =	~10	0.13	>10
IC_{50} (GSK-3) =	>10	0.06	>10

Abbildung 6-4: Inhibition von *Pf*GSK-3 und GSK-3 durch die Verbindungen **77**, **78** und **81**

7-Amino-9-(2-chlorphenyl)-4-thioxo-3,4-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-8-carbonitril (**78**) zeigte eine mit **44d** vergleichbare inhibitorische Aktivität an *Pf*GSK-3. Die Säuger-GSK-3 wurde durch **78** mit einem IC_{50} -Wert von 60 nM gehemmt, das entspricht einer doppelt so hohen Potenz an GSK-3 wie an *Pf*GSK-3. Das Ziel einer selektiven Hemmung der *Pf*GSK-3 konnte durch die Verbindung **78** also nicht erreicht werden, jedoch wurde ein relativ potenter, neuer GSK-3-Inhibitor identifiziert. Als Vergleich ist hier der GSK-3-Inhibitor CT 99021 (**24**) anzuführen, der im gleichen Testsystem bei einer ATP-Konzentration von 15 μ M die GSK-3 mit einem IC_{50} -Wert von 110 nM hemmt (Literaturwert (GSK-3 β)¹⁴⁹: 6.7 nM bei 1 μ M ATP).

6.1.5 Struktur-Wirkungsbeziehungen und Docking-Studien

Eindeutige Struktur-Wirkungsbeziehungen, die einen bestimmten Bindungsmodus der Thieno[2,3-*b*]pyridine in der ATP-Bindetasche unterstützen würden, sind aus den Ergebnissen der biologischen Testungen bisher nicht abzuleiten. Mit dem Ziel, den Bindungsmodus der Thieno[2,3-*b*]pyridine zu identifizieren, wurden Docking-Studien durchgeführt. Da noch keine Kristallstruktur der plasmodialen GSK-3 zur Verfügung steht, wurden verschiedene Homologiemodelle generiert. Diese basieren auf der bekannten *Pf*GSK-3-Aminosäuresequenz und verschiedenen Röntgenkristallstrukturen der Cokristallisate von *Hs*GSK-3 β mit unterschiedlichen Liganden wie AMP-PNP, AR-A014418, Maleinimidderivaten, Staurosporin, Alsterpaullon und Indirubinderivaten (PDB-Codes: 1j1b¹⁵⁰, 1q5k⁴⁹, 2ow3¹⁵¹, 1r0e¹⁵², 1uv5¹⁵³, 2o5k¹⁵⁴, 1q3d, 1q3w, 1q4l und 1q41⁵⁶). Die

Homologiemodelle und Docking-Studien wurden von Sebastian Kruggel und Thomas Lemcke (Institut für Pharmazie, Universität Hamburg) erarbeitet.¹⁵⁵

In Einklang mit den heterogenen Ergebnissen der biologischen Testungen, ausgedrückt durch die IC_{50} -Werte, zeigen auch die Docking-Studien keinen eindeutigen Bindungsmodus. Verschiedene Posen der Liganden, d. h. der aktiven Verbindungen, werden gut bewertet.

Im Folgenden werden die Kristallstruktur des Cokristallisates aus Verbindung **44d** und HsGSK-3 (Anselm Oberholzer, Universität Bern und Laurent Meijer, Station Biologique, Roscoff; persönliche Mitteilung) sowie drei Dockinglösungen der 2-Aroylthienopyridine **42** diskutiert und mit den Bindungsmodalitäten des ATP in der Bindetasche verglichen. In Abbildung 6-5 ist eine schematische Illustration des ATP in seiner Bindetasche zu sehen. Zwischen dem Adenin-Grundkörper des ATP und den Aminosäuren der Hinge-Region werden drei Wasserstoffbrückenbindungen nach dem Donor-Akzeptor-Donor-Prinzip ausgebildet. Die als *gatekeeper* bezeichnete Aminosäure, die sich N-terminal direkt an die Hinge-Region anschließt, sitzt am Eingang der hinteren hydrophoben Tasche, die von ATP nicht adressiert wird. ATP-kompetitive Kinase-Inhibitoren können jedoch mit dieser Region in Wechselwirkung treten. Über die Einbeziehung der hydrophoben Tasche kann die Potenz und Selektivität eines Hemmstoffes gesteigert werden. Durch den Ribose- und den Phosphatteil des ATPs werden weitere Regionen der Bindetasche besetzt.¹⁵⁶

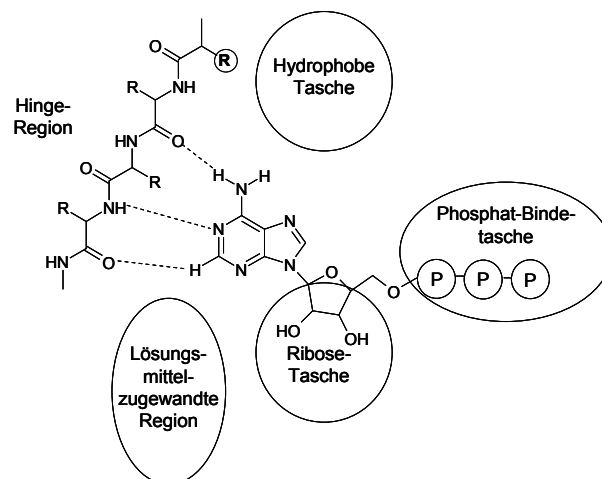


Abbildung 6-5: vereinfachte Darstellung von ATP in seiner Bindetasche.

(Wasserstoffbrückenbindungen sind gestrichelt gekennzeichnet, der Rest der als *gatekeeper* bezeichneten Aminosäure ist mit einem Kreis umrahmt; modifiziert nach Vulpetti et al.¹⁵⁶)

Kristallstruktur von **44d** in humaner GSK-3 β

Die Struktur des Cokristallisates der Verbindung **44d** mit Säugetier-GSK-3 ist in Abbildung 6-7 zu sehen. Der Abstand zwischen Wasserstoffbrückenakzeptor und -donor beträgt in einer Wasserstoffbrückenbindung typischerweise 2.8 bis 3.2 Ångström.¹⁵⁷ Es ist zu erkennen, dass der Pyridin-Stickstoff als Wasserstoffbrückenakzeptor eine Bindung über ein Wassermolekül, welches sich im hinteren Bereich der Bindetasche befindet, zum Asp133 ausbilden kann. Der Stickstoff der Aminogruppe in Position 6 des Thienopyridins fungiert als Wasserstoffbrückendonator und bildet eine entsprechende Wechselwirkung mit dem Val135 aus. Der Phenylring in Position 4 kann Interaktionen mit den Aminosäuren am Boden der Bindetasche (Gln185 und Asn186) eingehen. Der Chlorsubstituent zeigt zur Decke der Tasche. Größere ortho-Substituenten könnten bei dieser Ausrichtung des 4-Phenylringes nicht mehr in die Tasche passen. Dies könnte die fehlende Aktivität der Thienopyridin-2-carbonitrile **44a-b** und **e** erklären, die große ortho-Substituenten am 4-Phenylring tragen.

In der Literatur wurde der Bindungsmodus von ähnlichen Verbindungen, den 3,6-Diamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridinen, in der ATP-Bindetasche der GSK-3 anhand von Docking-Studien diskutiert. Die von Chioua et al. dargestellten Derivate haben insbesondere eine große Ähnlichkeit mit den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten 3,6-Diamino-2*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridinen. Eine dieser Verbindungen, das 3,6-Diamino-4-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbonitril **110**, zeigte eine inhibitorische Aktivität an den getesteten Proteinkinasen DYRK1A, CDK5 und GSK-3 (IC₅₀: 11 μ M, 0.41 μ M und 1.5 μ M).¹⁵⁸

Eine Docking-Studie, die von den Autoren durchgeführt wurde, legt einen Bindungsmodus nahe, bei dem von der 6-Aminogruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum Asp133 der Hinge ausgebildet wird, wodurch weitere Bindungen vom Pyridin-Stickstoff und vom N-1 des Pyrazols zum Val135 möglich sind. Der Ligand wird hier wie ATP nach dem Donor-Akzeptor-Donor-Prinzip gebunden. Der Phenylrest ragt in dieser Pose in eine hydrophobe Tasche an der Rückseite der ATP-Bindestelle.¹⁵⁸

In Abbildung 6-6 ist eine schematische Darstellung der unterschiedlichen Bindungsmodi der Verbindungen **110** (abgeleitet aus Docking-Studien) und **44d** (aus dem Cokristallisat mit HsGSK-3) zu sehen. Bei der Struktur des Cokristallisates von **44d** in Säuger-GSK-3 sind zwar auch die 6-Aminogruppe und der Pyridin-Stickstoff an den Wasserstoffbrückenbindungen zur Hinge-Region beteiligt, allerdings ist der gesamte Grundkörper um

180° gedreht, und die Bindung zum Asp133 wird zudem über ein Wassermolekül vermittelt. Eine dritte Bindung zum Asp133 fehlt.

Obwohl die Verbindungen eine ähnliche Struktur besitzen, verfügen sie möglicherweise über einen unterschiedlichen Bindungsmodus in der ATP-Bindetasche der humanen GSK-3.

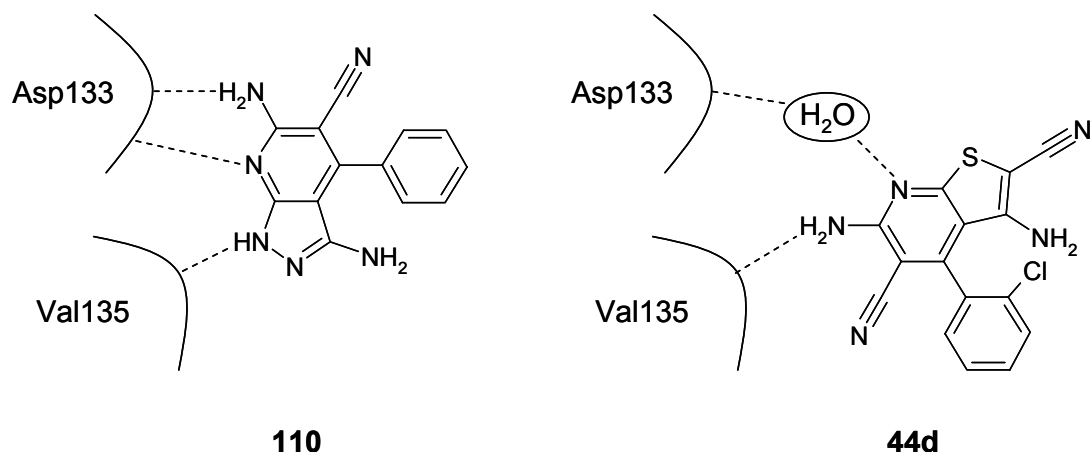


Abbildung 6-6: Vergleich der Bindungsmodi von **110** (aus Dockingstudien) mit **44d** (aus einer Kristallstruktur) in GSK-3

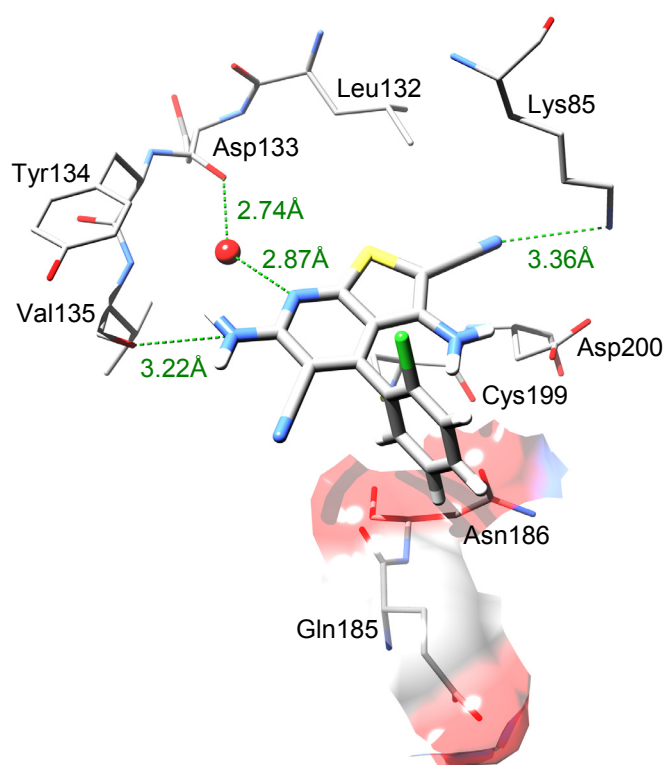


Abbildung 6-7: Röntgenkristallstruktur des Cokristallisates von **44d** in GSK-3 (bearbeitet mit Chimera¹⁵⁹ durch Sebastian Kruggel, Entfernungen [Å] sind grün dargestellt, Wassermolekül als rote Kugel)

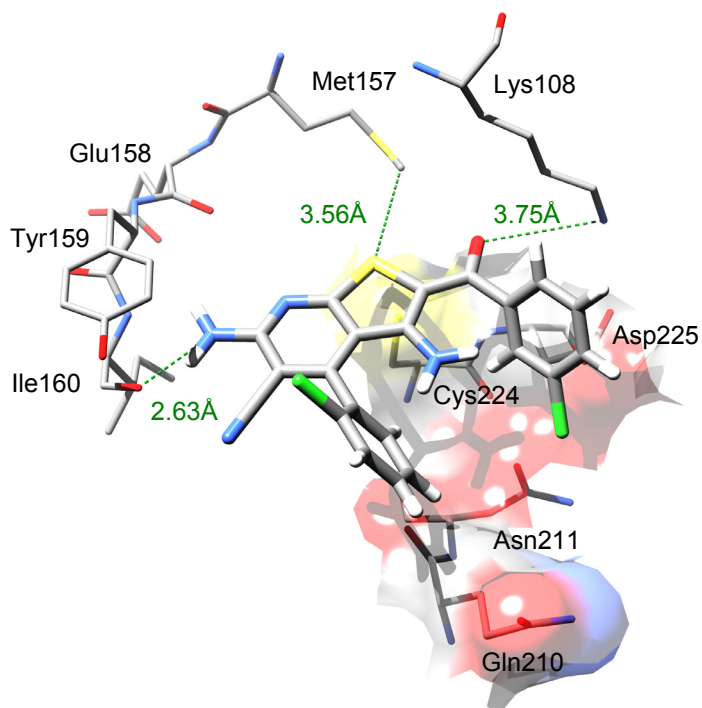


Abbildung 6-8: Docking-Lösung 1: **42v** in der ATP-Bindetasche der *Pf*GSK-3
(Homologiemodell basierend auf 1q41, bearbeitet mit Chimera¹⁵⁹ durch Sebastian Krügel, Entfernungen [Å] sind grün dargestellt)

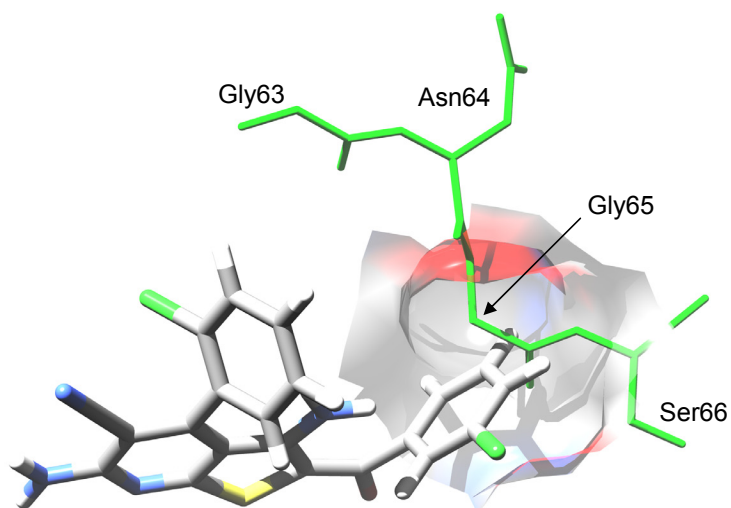


Abbildung 6-9: Ausschnitt aus Docking-Lösung 1: **42v** in der ATP-Bindetasche der *Pf*GSK-3
(Struktur der *Pf*GSK-3 in der Oberflächendarstellung, Struktur der *Hs*GSK-3 (aus der Struktur des Cokristallisates mit Verbindung **44d**) in grün, bearbeitet mit Chimera¹⁵⁹)

Dockinglösung 1: Vergleich zum Cokristallisat von **44d** und *HsGSK-3*

Abbildung 6-8 stellt Dockinglösung 1 dar, in der der Thienopyridin-Grundkörper der Verbindung **42v** in einer vergleichbaren Pose in der ATP-Bindetasche der *PfGSK-3* zum Liegen kommt wie Verbindung **44d** in der Kristallstruktur des Cokristallisates mit humaner GSK-3.

Beim Vergleich der Bindetaschen der beiden Kinasen fallen die Unterschiede in der Hinge-Region ins Auge. Deutlich zu erkennen sind die unterschiedlichen Gatekeeper (Leu 132 in *HsGSK-3* und Met157 in *PfGSK-3*). Des Weiteren ist Aspartat (Asp133) in der *PfGSK-3* durch Glutamat (Glu158) ersetzt, Valin (Val135) durch Isoleucin (Ile160). Diese Reste sind jedoch nicht in den Innenraum der Bindetasche orientiert, die Unterschiede haben deswegen wahrscheinlich keine große Bedeutung. Darüber hinaus gibt es weitere Sequenzunterschiede: Wo in der humanen GSK-3 Glu137 und Arg141 über eine Salzbrücke stabilisiert werden können, befinden sich in der *PfGSK-3* Gln162 und Lys166, die keine Salzbrücke ausbilden können. Im Gegensatz zum Arg141 in *HsGSK-3* ist das Lys166 der *PfGSK-3* also zu Wechselwirkungen mit Liganden fähig.

In dieser Dockinglösung wird wie bei der Kristallstruktur eine Wasserstoffbrückenbindung von der 6-Aminogruppe des Thienopyridins **42v** zur Hinge-Region, hier zum Ile160 ausgebildet. Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass die Thienochinoline **45** und das Amidin **81** keine inhibitorische Wirkung aufweisen. Diese Verbindungen haben in Position 6 keine freie Aminogruppe, die eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hinge-Region aufbauen könnte.

Im hinteren Teil der Tasche ist Platz für ein Wassermolekül, vergleichbar zur Kristallstruktur der humanen GSK-3 mit Verbindung **44d**.

Der Phenylring des 2-Aroylrestes ist aus der Bindetasche herausgedreht, der meta-Chlorsubstituent zeigt nach unten und kann mit dem Taschenboden hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden. Der Abstand vom Inhibitor zur hinteren Taschenwand ist im Vergleich zur Entfernung von **44d** zur hydrophoben Tasche der *HsGSK-3* größer, erkennbar am Abstand der Nitril- bzw. Carbonylgruppe zum Lys85 (3.36Å) bzw. Lys108 (3.75Å).

Der Aroylrest in Position 2 scheint entscheidend für die Selektivität der Verbindungen für *PfGSK-3* zu sein. Im Gegensatz zu den 2-Aroylthienopyridinen **42** waren die Thienopyridin-2-carbonitrile **44**, bei denen anstelle des Aroylrestes eine Nitrilgruppe in Position 2 sitzt, alle unselektiv.

Kruggel und Lemcke zeigten, dass der Eingang der hydrophoben Tasche in der ATP-Bindetasche in der *Pf*GSK-3 sehr viel enger als in der humanen GSK-3 ist oder je nach Homologiemodell auch ganz geschlossen sein kann.¹⁶⁰ Eine Selektivität könnte also durch Adressierung dieser Struktur erreicht werden. Die Nitrilgruppe der Verbindung **44d** zeigt in der Kristallstruktur direkt auf das Lys85. In der *Pf*GSK-3 würde sie in ähnlicher Weise mit dem Lys108 in Wechselwirkung treten. Bei der Verbindung **42v** dagegen ragt der Benzoylrest weiter nach vorne (Abbildung 6-8). Eine mögliche Erklärung für die Selektivität der 2-Aroylthienopyridine für *Pf*GSK-3 könnte sein, dass der Benzoylrest in einer Gegend zum Liegen kommt, in der durch das Oberflächenprofil im Vergleich zur humanen GSK-3 bessere hydrophobe Kontakte mit dem Aromaten möglich sind.

Als eine andere Erklärung für den 2-Benzoylrest als essentielles Strukturmerkmal für die Selektivität der Verbindungen **42** könnte angeführt werden, dass dieser Rest in der ATP-Bindetasche der *Hs*GSK-3 an einer Stelle zum Liegen kommen müsste, wo nicht genügend Platz vorhanden ist. Allerdings zeigten Kruggel und Lemcke, dass die ATP-Bindetasche der *Hs*GSK-3 insgesamt etwas breiter und tiefer ist als beim plasmodialen Homologen.¹⁶⁰

In Abbildung 6-9 ist die Verbindung **42v** in der ATP-Bindetasche der *Pf*GSK-3 (gezeigt in der Oberflächendarstellung) zu sehen. Ein Teil des *glycine-rich loop* der humanen GSK-3 aus dem Cokristallisat mit **44d** ist grün abgebildet. Der Aroylrest füllt eine kleine Tasche an der rechten Taschenwand der *Pf*GSK-3 aus. Legt man die Strukturen der beiden Kinasen übereinander, befindet sich in diesem Hohlraum die Aminosäure Gly65 der *Hs*GSK-3. Das könnte bedeuten, dass der Platz für den 2-Aroylrest in der ATP-Bindetasche der *Hs*GSK-3 eingeschränkt ist, was die Selektivität der 2-Aroylthienopyridine für die plasmodiale GSK-3 begründen könnte. Der *glycine-rich loop* ist allerdings sehr flexibel. Aus diesem Grund ist es fraglich, ob durch Gly65 eine derartige Einschränkung in der *Hs*GSK-3 vorliegen kann.

Der Phenylrest in Position 4 ist bei Verbindung **42v** in der *Pf*GSK-3 leicht verdreht, so dass der ortho-Substituent mehr Platz an der Taschendecke findet. Dies könnte der Grund sein, dass bei den 2-Aroylthienopyridinen **42** der größere ortho-Iodsubstituent toleriert wird, während es bei einer ortho-Iodsubstitution der Thienopyridin-2-carbonitrile **44** zum Aktivitätsverlust kommt (vgl. Verbindung **44b**).

Die geringere Aktivität der Verbindung **42d'** mit einem 2,6-Dichlorphenylrest in Position 4 kann ebenso durch eine geringe Höhe der ATP-Bindetasche erklärt werden, da der Phenylrest in einer entsprechenden Pose senkrecht zur Taschenebene steht, und die beiden Chlorsubstituenten so nicht ausreichend Platz finden.

Anhand der oben beschriebenen Dockinglösung 1 können einige Struktur-Wirkungsbeziehungen der Thienopyridine als *Pf*GSK-3-Inhibitoren erklärt werden. Die 2-Aroylthienopyridine **42** können aber auch andere Bindungsmodi aufweisen als der, der dem Bindungsmodus der Verbindung **44d** in humaner GSK-3 entspricht. In den folgenden Abschnitten werden zwei weitere Dockinglösungen vorgestellt.

Dockinglösung 2: Wechselwirkung zwischen Carbonylgruppe und Hinge-Region

Abbildung 6-10 zeigt die Hit-Struktur aus dem Hochdurchsatz-Screening (**41**) in der ATP-Bindetasche eines *Pf*GSK-3-Homologiemodells. Im Vergleich zur Dockinglösung 1 liegt der Ligand hier um 180° gedreht. Wasserstoffbrückenbindungen können zwischen der Carbonylgruppe des Inhibitors und der Hinge-Region (Ile160) und zwischen der 6-Aminogruppe und Lys108 ausgebildet werden.

Der 2-Benzoylrest liegt in dieser Pose in einer Region, die sich durch Sequenzunterschiede im Vergleich zum humanen Enzym auszeichnet. Anstelle des Arg141 in der *Hs*GSK-3, das durch eine Salzbrücke stabilisiert ist, befindet sich in der *Pf*GSK-3 das Lysin166, das zu Wechselwirkungen mit dem Liganden fähig ist.

Der ortho-Substituent des 4-Phenylrestes zeigt Richtung Taschenboden und kann dort hydrophobe Wechselwirkungen ausüben. Geringere oder nicht vorhandene Aktivität der Verbindungen mit größerem ortho-Substituenten bzw. mit 2,6-Disubstitution könnten auch hier mit der geringen Höhe der Tasche erklärt werden.

Dockinglösung 3: Wechselwirkung zwischen 5-Nitril- sowie 6-Aminogruppe und Hinge-Region

In den oben genannten Beispielen für mögliche Bindungsmodi der 2-Aroylthienopyridine gibt es jeweils nur einen direkten Kontakt zur Hinge-Region. Das dritte Beispiel, zu sehen in Abbildung 6-11, stellt einen Bindungsmodus dar, bei dem zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur Hinge-Region ausgebildet werden können. Die 5-Nitrilgruppe und die 6-Aminogruppe fungieren dabei als Wasserstoffbrückenakzeptor bzw. -donor und gehen Wechselwirkungen mit Ile160 bzw. Glu158 ein.

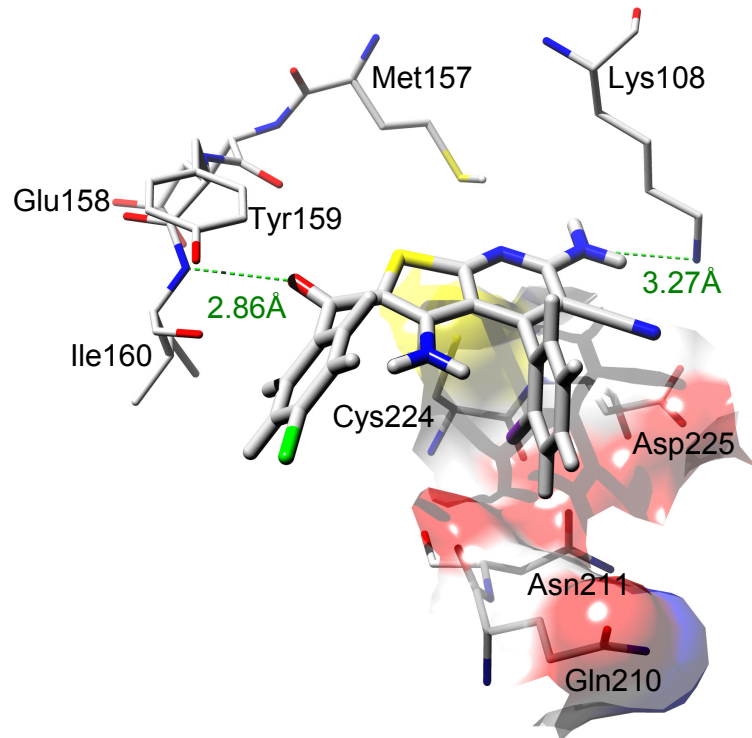


Abbildung 6-10: Docking-Lösung 2: Verbindung **41** (Hit-Struktur) in *Pf*GSK-3
(Homologie-Modell basiert auf Kristallstruktur 1q41, bearbeitet mit Chimera¹⁵⁹,
Abstände [Å] sind grün dargestellt)

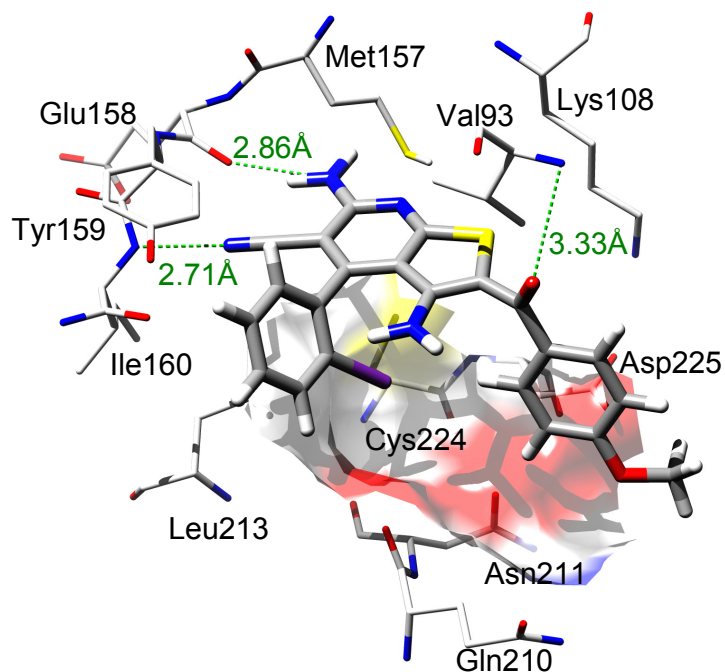


Abbildung 6-11: Dockinglösung 3: **42j** in der ATP-Bindetasche der *Pf*GSK-3
(Homologie-Modell basiert auf Kristallstruktur 1q41, bearbeitet mit Chimera¹⁵⁹,
Abstände [Å] sind grün dargestellt)

Die Carbonylgruppe des 2-Aroylrestes zeigt nicht wie bei Dockinglösung 1 nach hinten, sondern nach oben und kann Wechselwirkungen mit Val93 an der Decke der Tasche eingehen. Der Aroylrest, der offenbar für die Selektivität der Verbindungen **42** verantwortlich ist, ist also auch bei dieser Pose an Wechselwirkungen mit dem Protein beteiligt.

Im Vergleich zu den anderen Dockinglösungen liegt der Inhibitor tiefer in der Tasche. Konstitutionelles Wasser, welches sich in der Kristallstruktur der humanen GSK-3 mit **44d** im hinteren Teil der Tasche befindet, ist hier scheinbar verdrängt worden.

Der ortho-Iodsubstituent des 4-Phenylringes zeigt wie bei Beispiel 2 in Richtung des Taschenbodens zu Cys224.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Dockinglösung 1, bei der die Lage des Inhibitors der der Verbindung **44d** im Cokristallisat mit *Hs*GSK-3 ähnelt, viele Struktur-Wirkungsbeziehungen belegt werden könnten. Allerdings brachten die Docking-Studien weitere plausible Dockinglösungen hervor. Bei der Bewertung der verschiedenen Posen durch die unterschiedlichen Scoring-Funktionen zeichnete sich eine leichte Überlegenheit der in Abbildung 6-9 dargestellten Dockinglösung 2 gegenüber den anderen hypothetischen Bindungsmodi ab, inklusive dem in der humanen Kristallstruktur vorgefundenem Modus.

Eine Erklärung für diese verschiedenen Posen können multiple Bindungsmodi sein, das bedeutet, dass ein Ligand oder ähnliche Liganden unter Ausbildung verschiedener Wechselwirkungen in derselben Target-Struktur unterschiedlich zum Liegen kommen können.¹⁶¹ Eine eindeutige Zuweisung eines Bindungsmodus kann nur über die Struktur eines Cokristallisates der einzelnen Verbindungen mit plasmodialer GSK-3 vorgenommen werden.

6.2 RET

6.2.1 Inhibition der RET-Kinaseaktivität

Die Pyridinderivate **54** und **55** sowie die Tetrahydrochinolin- und -naphthyridinderivate **51**, **52** und **53** wurden in den Laboratorien von Luca Mologni (Università degli Studi di Milano-Bicocca, Monza, Italien) in einem ELISA-Kinase-Assay auf ihre RET-inhibitorische Aktivität untersucht. In den nachfolgenden Absätzen werden die Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

Pyridinderivate

Die Inhibition der RET-Kinase durch die Pyridinverbindungen **54** und **55** ist in Abbildung 6-12 in Form von pIC_{50} -Werten dargestellt.

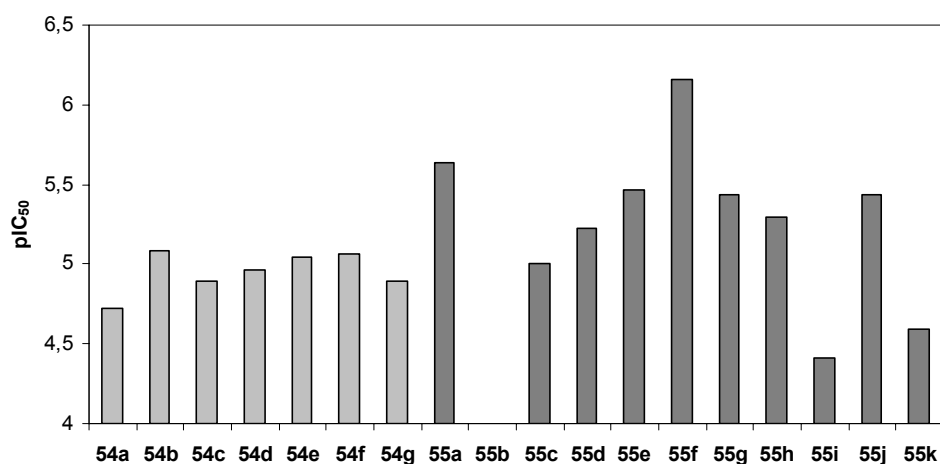


Abbildung 6-12: Inhibition der RET-Kinase durch die Pyridinverbindungen **54** (hellgraue Balken) und **55** (dunkle Balken)

Die Pyridinderivate ohne Ketogruppe in der Seitenkette **54** zeigen hier eine etwas geringere Aktivität als die Verbindungen **55**, die eine Ketogruppe besitzen. Besonders deutlich wird dies beim paarweise Vergleichen der 6-Amino-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitrile, zum Beispiel **54a** ($IC_{50} = 19 \mu M$) und **55e** ($IC_{50} = 3.4 \mu M$) sowie **54b** ($IC_{50} = 8.3 \mu M$) und **55f** ($IC_{50} = 0.69 \mu M$), die sich jeweils nur durch das Vorhandensein dieser

Ketogruppe unterscheiden. Darüberhinaus wirkt sich ein para-Chlorsubstituent des Phenylringes in der Seitenkette offenbar günstig auf die inhibitorische Aktivität der Verbindungen aus. Das 2-Amino-6-[[2-(4-chlorphenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl]-4-(3-thienyl)-pyridin-3,5-dicarbonitril (**55f**) war in den Untersuchungen auf RET-Kinase-Inhibition von allen getesteten Verbindungen der potenteste Vertreter.

Andere Substituenten in para-Stellung führten zu einer Abschwächung der inhibitorischen Wirkung (**55g-j**), meta-Substitutionen werden anscheinend noch weniger toleriert (vgl. Verbindung **55k**).

Die Verbindungen mit einem 4-Phenylrest, der mit Brom substituiert ist, zeigten geringere bis keine Aktivität (**55b-d**).

Die Verbindung mit einem unsubstituierten Phenylring in Position 4 (**55a**) zeigte eine vergleichsweise gute Hemmwirkung. Diese Struktur und viele ihrer Derivate sind allerdings schon bekannt, deswegen wurden keine weiteren Verbindungen dieser Art dargestellt, sondern hauptsächlich solche mit 3-Thienylrest in Position 4.

Tetrahydrochinoline und -naphthyridine

Auch in der Gruppe der Tetrahydrochinoline wurden Verbindungen mit und ohne Carbonylfunktion in der Seitenkette synthetisiert und auf ihre Kinase-inhibitorischen Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen auf Kinase-inhibitorische Aktivität ist in Abbildung 6-13 zu sehen.

Die Verbindungen **51a-b** und **52a-b** tragen in Position 4 einen 3-Thienylrest. Vergleicht man die Verbindungen miteinander, so sind auch hier die mit einer Ketogruppe in der Seitenkette wirksamer als diejenigen ohne Oxofunktion. Im Gegensatz zu den Pyridinderivaten wirkt sich jedoch ein para-Chlorsubstituent im Phenylring der Seitenkette ungünstig aus. Dies spricht für einen unterschiedlichen Bindungsmodus der Pyridin- und Tetrahydrochinolinderivate (vgl. Abschnitt 6.2.4).

Bei den Vertretern dieser Substanzgruppe mit einem 2-Bromphenylrest in Position 4 (**51c** und **52c**) treten offenbar umgekehrte Verhältnisse auf. Hier weist die Verbindung ohne Ketogruppe in der Seitenkette (**51c**) eine höhere Hemmwirkung auf.

Das Tetrahydrochinolinderivat **52d** mit einer Amidstruktur in der Seitenkette und das Tetrahydronaphthyridinderivat **53** zeigten keine nennenswerte Aktivität an der RET-Kinase.

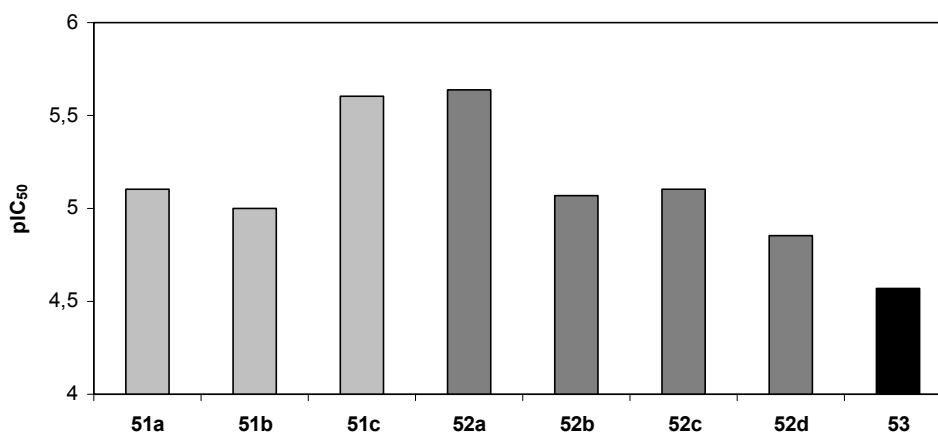


Abbildung 6-13: Inhibition der RET-Kinase durch die Tetrahydrochinoline **51** und **52** sowie durch das Tetrahydronaphthyridin **53**

6.2.2 Selektivität einzelner Verbindungen

Es wurde untersucht, ob die Verbindungen, für die eine RET-inhibitorische Wirkung nachgewiesen wurde, auch andere Kinasen hemmen. Dafür wurden die fünf Vertreter mit der höchsten RET-inhibitorischen Aktivität an den beiden Kinase ALK und ABL getestet. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen sollte abgeleitet werden, ob die Verbindungen eine Selektivität für die RET-Kinase aufweisen.

ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) ist wie RET eine Rezeptortyrosinkinase und wird wie diese im Nervensystem während der Entwicklungsphase exprimiert. Bei Abwesenheit eines Liganden resultiert die Expression von ALK in einer verstärkten Apoptose, während die Aktivierung durch einen Liganden oder konstitutiv aktivierte Kinase die Apoptose hemmt, aus diesem Grund zählt ALK zu den sogenannten „*dependence receptors*“.¹⁶² Durch Chromosomen-Translokationen entstehen konstitutiv aktivierte Fusionsproteine wie das Nucleophosmin (NPM)-ALK, die auch in Geweben außerhalb des Nervensystems vorkommen. Sie werden mit der Entwicklung des anaplastischen großzelligen Non-Hodgkin-Lymphoms (ALCL, *anaplastic large-cell lymphoma*), sowie inflammatorischer myofibroblastischer Tumore (IMTs, *inflammatory myofibroblastic tumors*) in Verbindung gebracht.¹⁶³

ABL (*Abelson tyrosine kinase*) gehört zu den Nicht-Rezeptortyrosinkinasen und ist ubiquitär in verschiedenen Geweben vorhanden. Sie spielt eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus und bei der Zellproliferation.¹⁶⁴ Durch Chromosomen-Translokation wird das

sogenannte Philadelphia-Chromosom gebildet, welches das chimäre Gen *BCR-ABL* beinhaltet. Dieses codiert für ein Protein mit konstitutiver Kinaseaktivität (BCR-ABL), die mit der Entstehung von chronisch myeloischer Leukämie (CML) in Verbindung gebracht wird.¹⁶⁵

In Abbildung 6-14 ist die Hemmwirkung der Tetrahydrochinolinderivate **51c**, **52a** sowie der Pyridinderivate **55a** und **e-f** auf die drei Kinasen RET, ALK und ABL durch die pIC_{50} -Werte veranschaulicht. Die getesteten Verbindungen zeigten auch für ALK eine inhibitorische Aktivität mit IC_{50} -Werten unter 10 μ M (pIC_{50} -Werte über 5) und verfügen also nicht über eine ausgeprägte Selektivität für RET. Die Verbindungen **52a**, **55a** und **55f** hemmen die Kinaseaktivität der RET drei- bis viermal stärker als die der ALK, sie zeigen eine etwas höhere Sensitivität für RET.

ABL ist eine Nicht-Rezeptortyrosinkinase und wird durch die getesteten Verbindungen sehr viel schwächer gehemmt als RET und ALK.

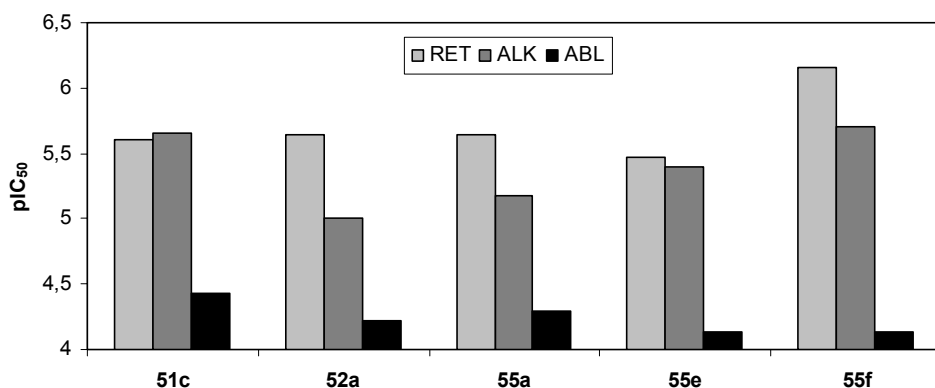


Abbildung 6-14: Inhibition von RET, ALK und ABL durch ausgewählte Verbindungen

RET und ALK sind Rezeptortyrosinkinasen und sehr viel enger verwandt als RET mit ABL. Dies wird aus dem Dendrogramm der Kinasen ersichtlich, das in Abbildung 6-15 skizziert ist.¹⁶⁶ Es ist deswegen nicht verwunderlich, dass die getesteten Verbindungen eine ähnliche Aktivität an RET und ALK haben und eine niedrigere an ABL.

Eine selektive Hemmung der RET-Kinaseaktivität gegenüber ALK scheint jedoch möglich zu sein. So wiesen Plaza-Menacho et al. eine Hemmung der RET-Kinase durch Sorafenib

mit einem IC_{50} -Wert von 6 nm nach, während für ALK und ABL IC_{50} -Werte von 25 bzw. >500 μ M ermittelt wurden.⁸⁷

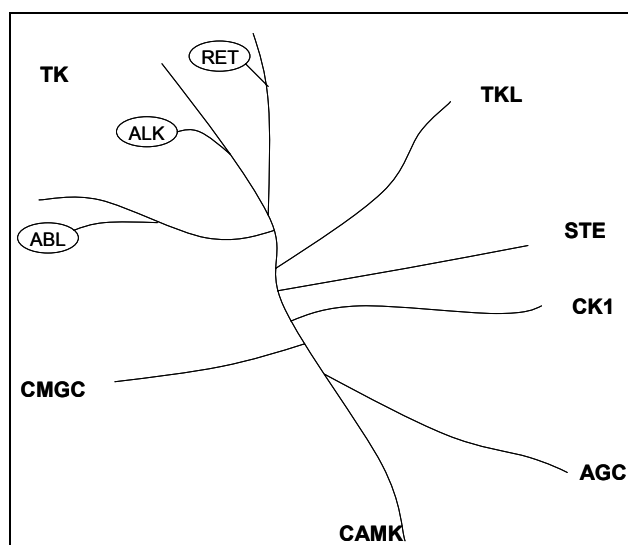


Abbildung 6-15: Dendrogramm des humanen Kinoms in vereinfachter Darstellung

6.2.3 Hemmung des Zellwachstums

Die fünf besten Vertreter wurden zusätzlich auf ihre antiproliferativen Eigenschaften getestet. Diese Testungen wurden mit RET-positiven [RET+] und RET-negativen [RET-] Zellen durchgeführt. Als [RET+]-Zelllinie wurde die TPC1 verwendet, die aus einem papillären Thyroidkarzinom stammt, das das RET/PTC1-Onkogen enthält und folglich konstitutiv aktivierte RET exprimiert.¹⁶⁷ Als Kontrolle wurde die [RET-]-Zelllinie LS174T eingesetzt, die aus Colonkarzinom-Zellen kultiviert wurde.¹⁶⁸

In Abbildung 6-16 ist zu sehen, dass nur die Verbindungen **52a** und **55f** eine nennenswerte Hemmung des Zellwachstums von TPC1-Zellen bewirkten.

Von diesen beiden zeigte lediglich **52a** eine gewisse Selektivität für Zellen mit konstitutiv aktivierter RET-Kinase. Bei den RET-positiven Zellen wurde das Zellwachstum um den Faktor 4-5 stärker gehemmt als bei den RET-negativen Zellen LS174T.

Die Verbindung **55f** dagegen hemmte das Zellwachstum in RET-negativen LS174T-Zellen sogar in stärkerem Maße als das der RET-positiven. Eine Hemmung des Wachstums der Zellen aufgrund einer RET-Tyrosinkinase-Inhibition durch die Verbindungen, insbesondere durch **55f**, kann aus diesem Grund nicht abgeleitet werden.

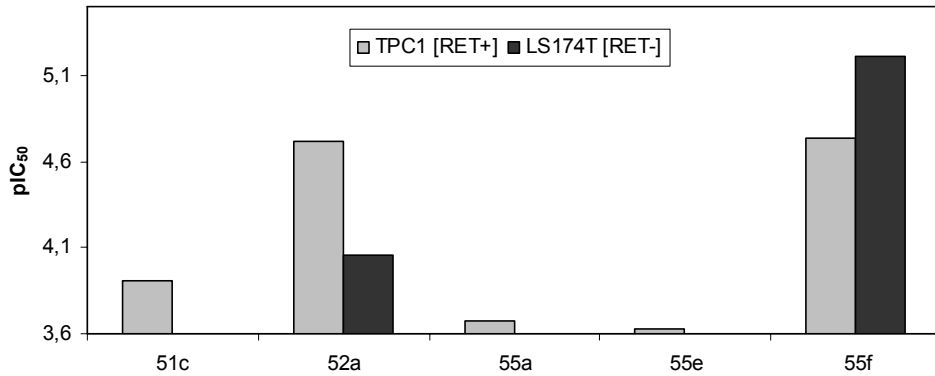


Abbildung 6-16: Inhibition des Wachstums von Tumorzelllinien

6.2.4 Docking-Studien

Von der RET-Tyrosinkinase-Domäne wurden bislang vier Kristallstrukturen veröffentlicht: Einerseits die unphosphorylierte Form, kokristallisiert mit 2',3'-cAMP (PDB-Code: 2ivs); andererseits die an Tyr905 phosphorylierte Form im Komplex mit AMP (2ivt) sowie den Inhibitoren PP1 (2ivv) und ZD6474 (Vandetanib, 2ivu).

Die Kinasedomäne der RET-Kinase besteht wie bei anderen Proteinkinasen aus dem kleineren N-Terminus mit einem achtsträngigem β -Faltblatt, der über die Hinge-Region (Tyr806-Ser811) mit dem größeren C-Terminus, in dem überwiegend α -Helices zu finden sind, verbunden ist. AMP bindet in der ATP-Bindetasche in der typischen Weise durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Hinge-Region, namentlich Glu805 und Ala807.¹⁶⁹

Der *gatekeeper* in der ATP-Bindetasche ist das Val804. Durch Mutationen dieser Aminosäure, die mit MEN2-Erkrankungen assoziiert sind (Austausch gegen die raumgreifenderen Aminosäuren Lysin oder Methionin), kann es zu Resistenzen gegenüber ATP-kompetitiven RET-Kinase-Inhibitoren wie PP1 und ZD6474 kommen.¹⁷⁰ Vergleichbares ist für Mutation des *gatekeepers* Thr315 der BCR-ABL und die Resistenzbildung gegenüber Imatinib bei der Therapie der Chronisch-Myeloischen Leukämie (CML) berichtet worden.¹⁷¹

Die Pyridinderivate **55e**, **55f** und das Tetrahydrochinolin **52a** wurden in die verschiedenen Strukturen der RET gedockt. Die Studien wurden von Thomas Lemcke, Universität Hamburg, durchgeführt. Einige Ergebnisse dieser Studien sollen hier diskutiert werden.

Dockinglösung 1

Dockinglösung 1 (Abbildung 6-17) zeigt **55f** in der ATP-Bindetasche der RET-Kinase. Der 6-Aminopyridin-3,5-dicarbonitril-Grundkörper liegt quer in der Tasche, der Thiophenring zeigt nach hinten und es kommt zur Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hinge-Region, nämlich vom Tyr806 zur Nitrilgruppe, von der Aminogruppe zum Ala807 und vom Ser811 zur Carbonylgruppe. Die Entstehung der typischen Hinge-Kontakte ist also in dieser Pose möglich. Allerdings wird die hydrophobe Tasche im rechten hinteren Teil in dieser Dockinglösung nicht von **55f** adressiert und eine Erklärung, warum der para-chlorsubstituierte Benzoylrest für die RET-inhibitorische Wirkung der Pyridinderivate **55** von Vorteil ist, kann mit diesem Bindungsmodus nicht gegeben werden, da dieser aus der Tasche hinausragt und offensichtlich keine Wechselwirkungen mit dem Protein eingeht.

Dockinglösung 2

In Abbildung 6-18 ist die Dockinglösung 2 zu sehen, bei der der Inhibitor quer in der Tasche sitzt. Der Thiophenring liegt rechts, der Aroylrest links in der Tasche. Beide ragen in dieser Pose nach vorne aus der Tasche heraus. Der Aroylrest ist von der Seite zu sehen, der Chlorsubstituent zeigt direkt nach vorne. Zur Hinge-Region wird lediglich eine Wasserstoffbrückenbindung vom Ala807 zur Carbonylgruppe der Verbindung ausgebildet, eine weitere befindet sich zwischen der 2-Aminogruppe und Ser891 am Boden der ATP-Bindetasche. Weitere Wechselwirkungen sind von der 3-Nitrilgruppe mit den Aminosäuren am Taschenboden (Asp892, Asn879) möglich. Obwohl bei dieser Dockinglösung die gesamte Breite mit dem Inhibitor ausgefüllt ist, wird auch hier wie bei Dockinglösung 1 die hintere Tasche nicht von dem Inhibitor adressiert, und auch die Aktivitätssteigerung durch Einführen eines para-Chlorsubstituenten am Benzoylrest in der Seitenkette kann nicht erklärt werden, da dieser offensichtlich keine Wechselwirkungen eingeht, sondern zur Lösungsmittel-zugewandten Region ausgerichtet ist.

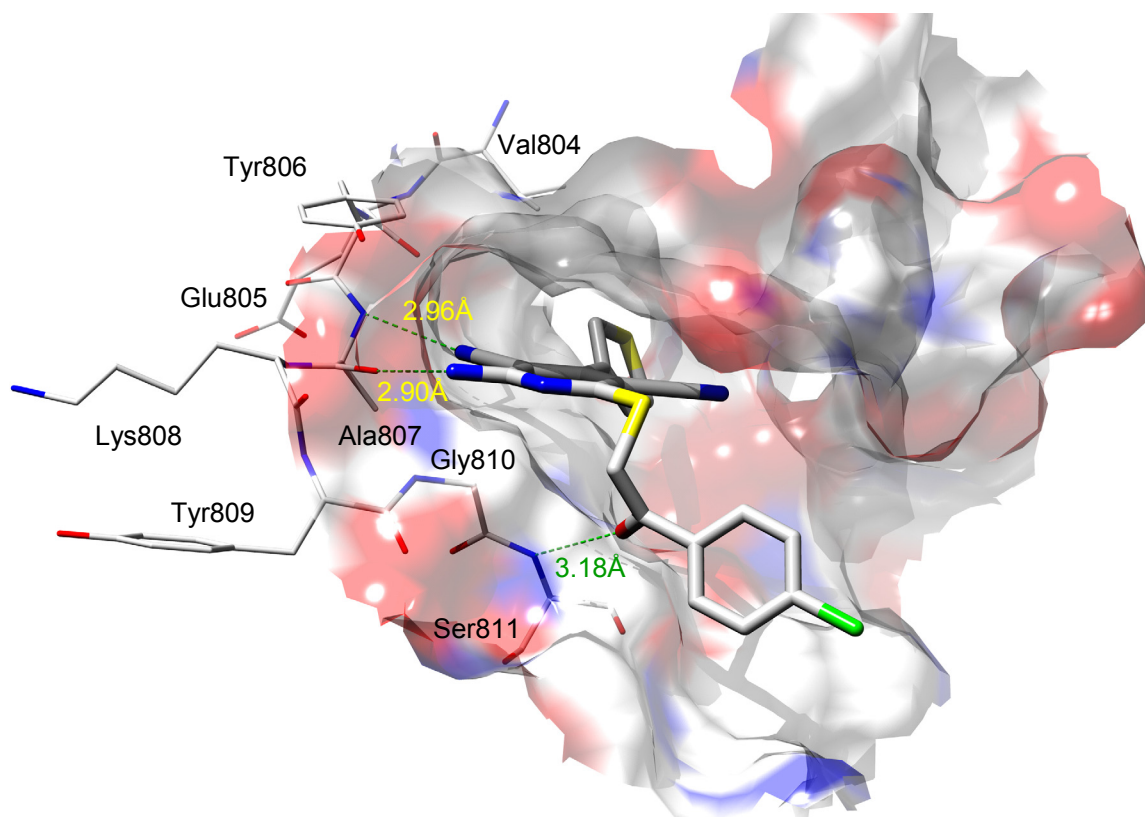


Abbildung 6-17: Dockinglösung 1: Verbindung **55f** in der ATP-Bindetasche der RET-Kinase (basierend auf Kristallstruktur 2ivs, bearbeitet mit Chimera¹⁵⁹, Abstände [Å] sind grün dargestellt)

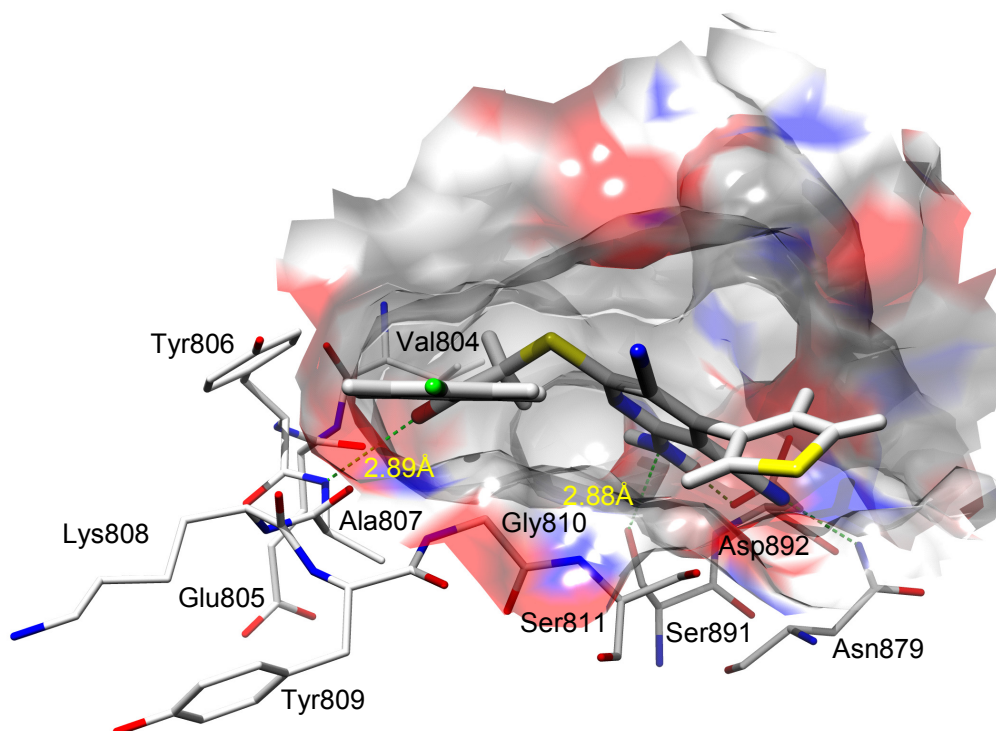


Abbildung 6-18: Dockinglösung 2: Verbindung **55f** in der ATP-Bindetasche (basierend auf Kristallstruktur 2ivs, bearbeitet mit Chimera¹⁵⁹, Abstände [Å] sind grün dargestellt)

Dockinglösung 3:

Die dritte Dockinglösung, die in Abbildung 6-19 veranschaulicht ist, zeichnet sich dadurch aus, dass der Aroylrest in die hintere hydrophobe Tasche ragt. Hier ist das 5,6,7,8-Tetrahydrochinolin-Derivat **52a** in die Kristallstruktur (2ivu) der RET-Kinase gedockt worden. Durch diese Lage des Inhibitors wird durch den Aroylrest die gleiche Region adressiert, wie durch den 4-Brom-2-fluorphenylrest des Vandetanibs in der von Knowles et al. veröffentlichten Kristallstruktur (vgl. Abbildung 6-20).¹⁶⁹

Eine Abnahme der inhibitorischen Aktivität bei Einführen eines 4-Chlorsubstituenten im 2-Aroylrest, resultierend in der Verbindung **52b** ($IC_{50} = 8.6 \mu M$), könnte anhand dieses Dockingergebnisses mit fehlendem Platz in der hinteren Tasche erklärt werden. Ebenso wäre ein 4-Chlorphenylaminocarbonylrest wie in Verbindung **52d** zu raumgreifend, was die noch schwächere Aktivität ($IC_{50} = 14 \mu M$) begründen könnte.

Sowohl das Vandetanib als auch **52a** sind an einer Wasserstoffbrückenbindung zum Ala807 der Hinge-Region beteiligt. Bei **52a** dient der Stickstoff der Nitrilgruppe als Wasserstoffbrücken-Akzeptor, beim Vandetanib eines der beiden Pyrimidin-Stickstoffatome. Vandetanib tritt zusätzlich über einige Wassermoleküle, die sich in der Tasche befinden in Wechselwirkung mit der Hinge (Ser811) und verschiedenen Aminosäuren (Ser891, Asp 892), die sich am Boden befinden.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei den Tetrahydrochinolinen ist bei den Pyridinderivaten die Verbindung **55f** mit einem 4-Chlorsubstituenten aktiver als das unsubstituierte **55e**. Auch für diese Pyridinderivate wurden Dockinglösungen gefunden, bei denen der Arylrest in der Bindetasche nach hinten ausgerichtet ist. In Abbildung 6-21 ist zu sehen, dass der Inhibitor **55f** über die Carbonylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum Ala807 ausbildet, der 2-Aroylrest ragt also nicht in die hintere hydrophobe Tasche. Eine höhere inhibitorische Aktivität der Verbindung **55f** könnte dadurch erklärt werden, dass ein 4-Chlorphenylrest besser zu Wechselwirkungen mit der rechten Taschenwand befähigt ist. Andere Substituenten in para-Position wie Methoxy (**55g**), Methyl (**55h**), Nitril (**55i**), Trifluormethyl (**55j**) könnten an dieser Stelle zu raumgreifend sein, was in einer abgeschwächten Hemmwirkung resultiert.

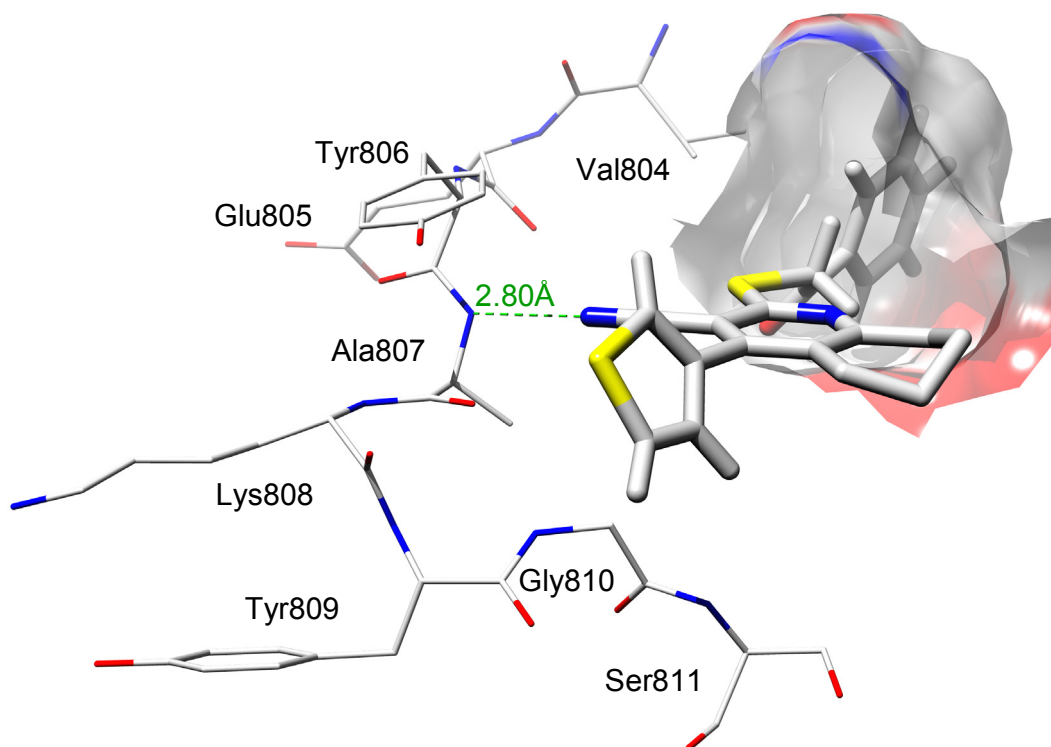


Abbildung 6-19: Dockinglösung 3: Verbindung **52a** in der ATP-Bindetasche
(basierend auf Kristallstruktur 2ivu, bearbeitet mit Chimera¹⁵⁹, Abstände [Å] sind grün dargestellt)

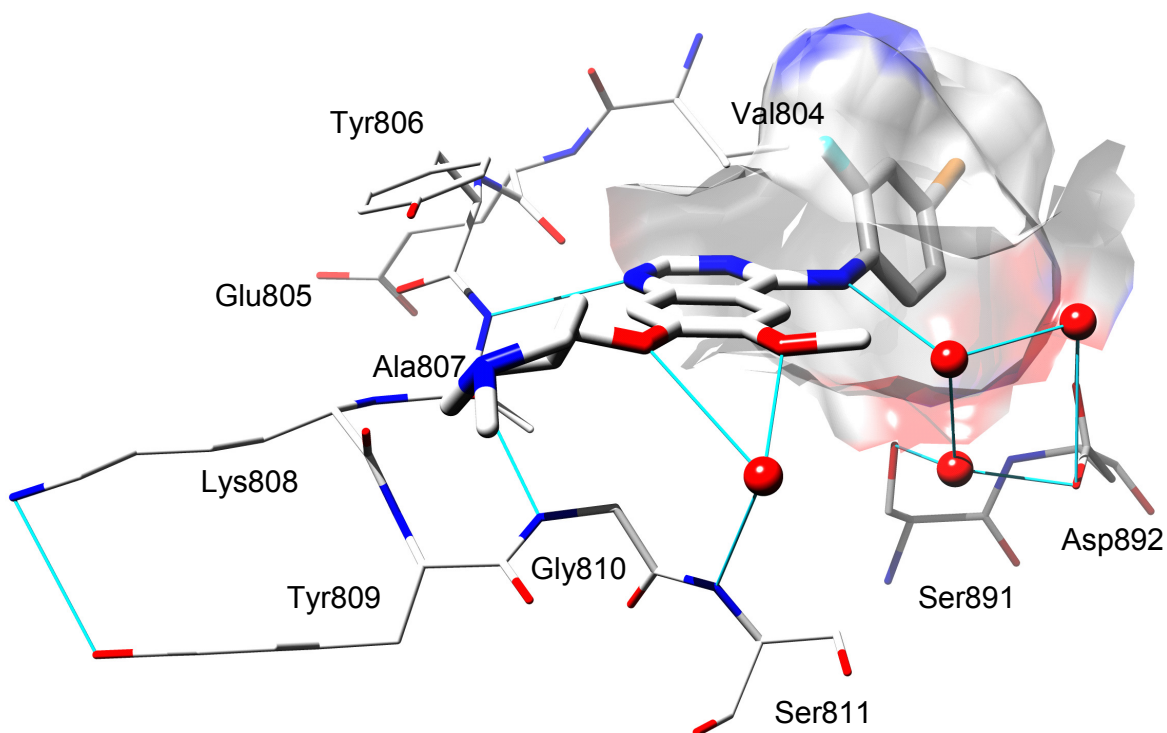


Abbildung 6-20: ZD6474 (Vandetanib) in der ATP-Bindetasche
(PDB-ID: 2ivu¹⁶⁹, bearbeitet mit Chimera¹⁵⁹, Wasserstoffbrückenbindungen sind blau gekennzeichnet, Wassermoleküle als rote Kugeln)

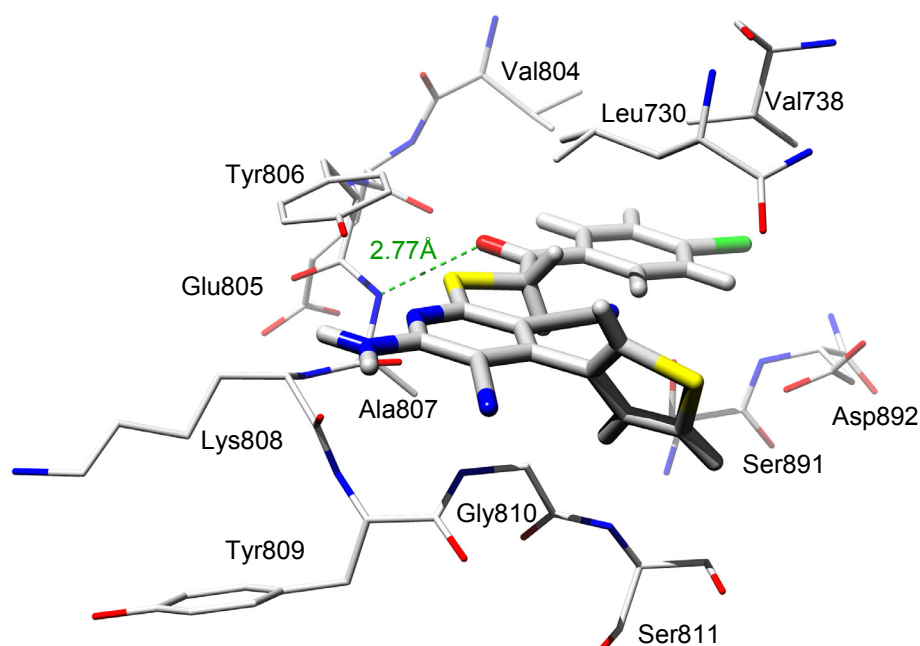


Abbildung 6-21: Verbindung **55f** in der ATP-Bindetasche der RET-Kinase
(basierend auf Kristallstruktur 2ivs, bearbeitet mit Chimera¹⁵⁹, Abstände [Å] sind grün dargestellt)

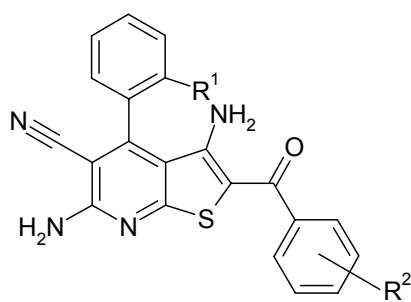
Wie für die *Pf*GSK-3-Inhibitoren wurden auch für die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten RET-Inhibitoren mehrere Dockingposen gefunden. Bei Dockinglösung 1 werden typische Wasserstoffbrückenbindungen zur Hinge ausgebildet, allerdings kann ein auf die inhibitorische Aktivität modulierend einwirkender para-Chlorsubstituent nicht erklärt werden, da dieser in dieser Stellung aus der Bindetasche heraus zeigt.

Dockinglösung 3 bietet weniger Kontakte zur Hinge, stattdessen wird aber die hydrophobe Tasche durch den Phenylrest der Seitenkette ausgefüllt, was die Aktivitätsmodulierung des 4-Chlorsubstituenten erklären könnte.

Da ein para-Chlorsubstituent bei den Pyridin- und Tetrahydrochinolinderivate verschiedene Einflüsse hat, verfügen die beiden Verbindungsklassen scheinbar über unterschiedliche Bindungsmodi. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei den RET-Inhibitoren wie auch bei den *Pf*GSK-3-Inhibitoren multiple Bindungsmodi möglich sind.

7 Zusammenfassung

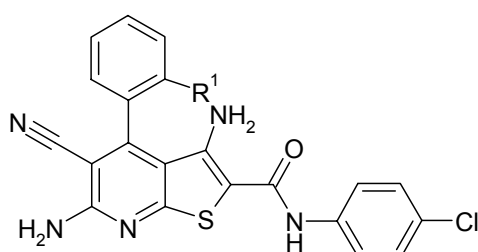
Ausgangspunkt der vorgelegten Arbeit war die Verbindung **41**, die mittels Hochdurchsatz-Screening als selektiver Inhibitor der plasmodialen GSK-3 identifiziert worden war. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Thieno[2,3-*b*]pyridine ausgehend von Thioxopyridinen und den analogen Tetrahydrochinolinen durch Alkylierung und nachfolgende Thorpe-Ziegler-Reaktion dargestellt und auf ihre biologische Aktivität an plasmodialer und humaner GSK-3 getestet. Die neuen Thienopyridine lassen sich in vier Klassen einteilen: 2-Aroylthienopyridine **42**, Thienopyridin-2-carboxamide **43**, Thienopyridin-2-carbonitrile **44** und Tetrahydrothienochinoline **45**.



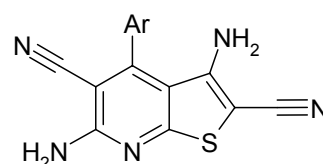
41: R¹ = I, R² = *p*-Cl

42

42v: R¹ = Cl, R² = *m*-Cl

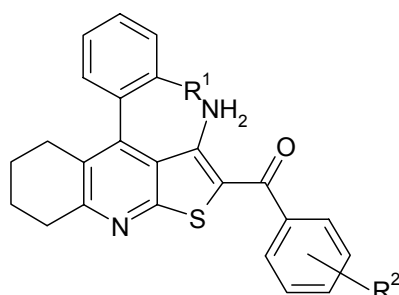


43

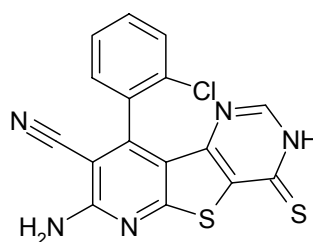


44

44d: Ar = 2-ClC₆H₄



45



78

In den Gruppen der 2-Aroylthienopyridine **42** und Thienopyridin-2-carbonitrile **44** wurden *Pf*GSK-3-Inhibitoren identifiziert.

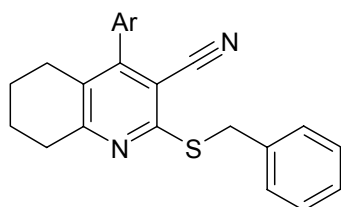
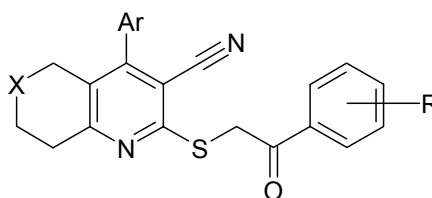
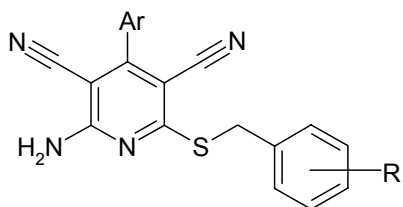
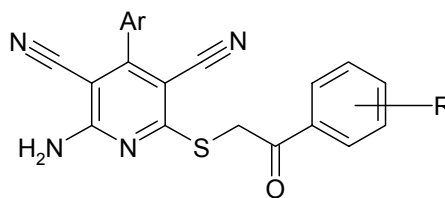
Einige Thienopyridin-2-carbonitrile **44** zeigten zwar eine hohe inhibitorische Aktivität an *Pf*GSK-3, wiesen jedoch keine ausreichende *Pf*GSK-3/GSK-3-Selektivität auf. Als Ausgangspunkt zur Entwicklung potentieller antiplasmodialer Wirkstoffe sind die Verbindungen **44** daher nicht geeignet. Vom Cokristallisat der Verbindung **44d** mit Säuger-

GSK-3 β konnte eine Röntgenkristallstruktur ermittelt werden, die den Inhibitor in der ATP-Bindetasche des Enzyms zeigt.

In der Gruppe der 2-Aroylthienopyridine **42** dagegen wurden selektive *Pf*GSK-3-Inhibitoren identifiziert. Von diesen zeigte das 3,6-Diamino-2-(3-chlorbenzoyl)-4-(2-chlorphenyl)-thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42v**) die höchste inhibitorische Aktivität und ist zur Zeit Gegenstand weiterer Untersuchungen bezüglich der biologischen Aktivität an weiteren Kinasen.

Weitere Reaktionen mit 3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44d**) führten zu zyklisierten Verbindungen, von denen das 7-Amino-9-(2-chlorphenyl)-4-thioxo-3,4-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-8-carbonitril (**78**) zwar keinen selektiven *Pf*GSK-3-Inhibitor darstellt, mit einem IC₅₀-Wert von 60 nM jedoch einen neuen starken Hemmstoff der Säuger-GSK-3.

Durch Alkylierung der Thioxopyridine und der Thioxotetrahydrochinoline bzw. -naphthyridine ohne anschließende Thorpe-Ziegler-Zyklisierung entstanden die offenkettigen Verbindungen **51-55**, für die eine Hemmwirkung der isolierten RET-Tyrosinkinase nachgewiesen wurde.

**51****52:** X = CH₂**52a:** Ar = 3-Thienyl, R = H**53:** X = N-CH₃**54****55****55f:** Ar = 3-Thienyl, R = 4-Cl

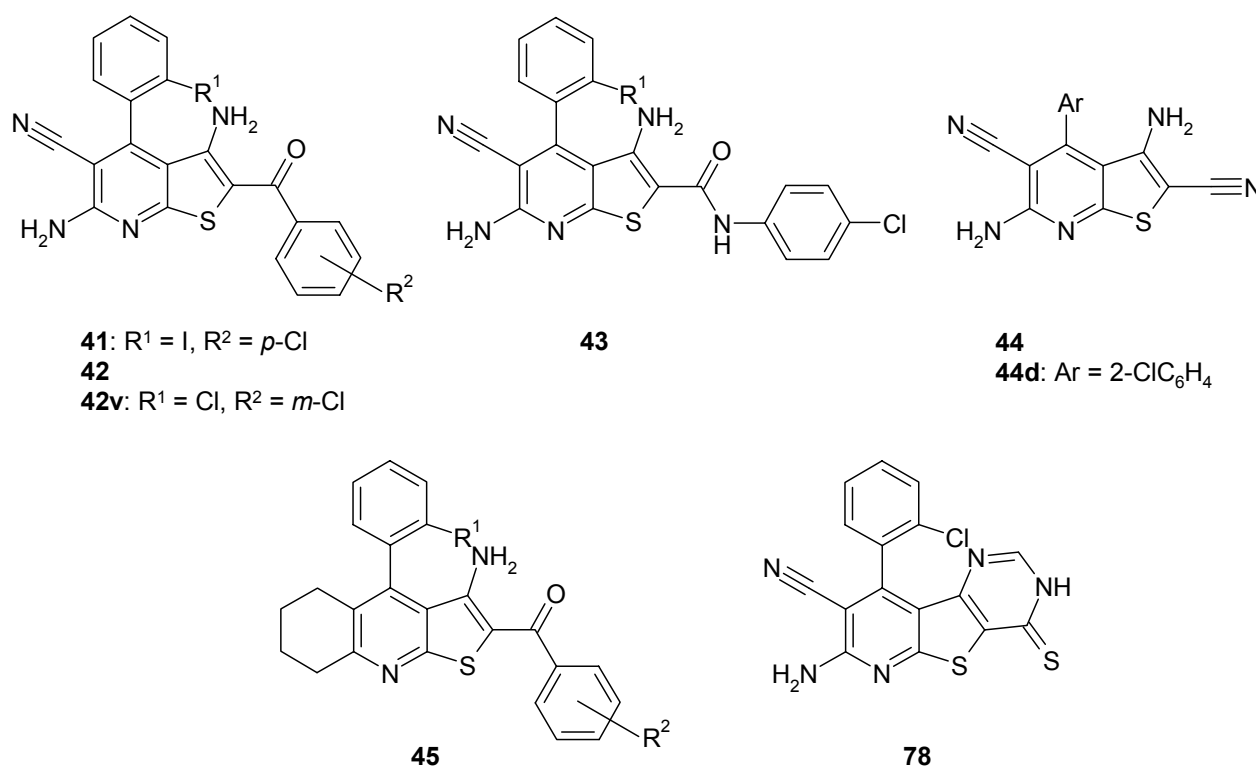
Einige Vertreter wurden zusätzlich auf ihre Fähigkeit getestet, das Wachstum bestimmter Tumorzellen zu hemmen. Darüber hinaus wurden diese Verbindungen auf ihre Selektivität für RET gegenüber anderen Tyrosinkinasen (ALK und ABL) untersucht.

Das Pyridinderivat **55f** zeichnete sich durch eine gute Hemmwirkung der isolierten RET mit einem IC_{50} -Wert im nanomolaren Bereich aus.

Die Verbindung **52a** aus der Gruppe der Tetrahydrochinoline verfügte über eine schwächere inhibitorische Aktivität an isolierter RET, zeigte jedoch eine ausgeprägtere Selektivität für RET gegenüber ALK und ABL im Vergleich zu Verbindung **55f**.

8 Summary

In the course of a high-throughput screening campaign compound **41** was identified as a selective *Pf*GSK-3-inhibitor by high-throughput-screening previously. In the context of this thesis new thieno[2,3-*b*]pyridines related to **41** were synthesised based on thioxopyridines and -tetrahydroquinolines by alkylation and subsequent Thorpe-Ziegler-reaction. These compounds can be divided in four groups: 2-arylthienopyridines **42**, thienopyridine-2-carboxamides **43**, thienopyridine-2-carbonitriles **44** and tetrahydrothienoquinolines **45**. All of them were tested for their biological behaviour on isolated plasmodial and mammalian GSK-3.



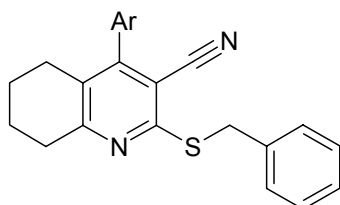
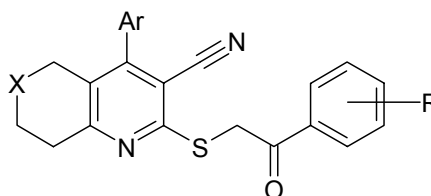
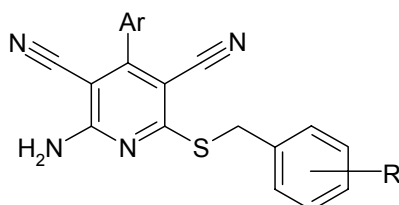
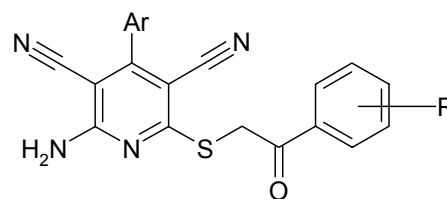
Only derivatives of the 2-arylthienopyridines **42** and thienopyridine-2-carbonitriles **44** showed inhibitory effects on *Pf*GSK-3.

Several thienopyridine-2-carbonitriles **44** inhibited *Pf*GSK-3 with IC_{50} -values in the nanomolar range. However, these compounds **44** lacked the required *Pf*GSK-3/GSK-3-selectivity and therefore appear not suitable as potential antimalarial agents. The structure of a complex of compound **44d** and mammalian GSK-3 determined by X-ray crystallography analysis showed the inhibitor in the ATP binding cleft.

On the other hand selective *Pf*GSK-3-inhibitors were identified in the class of 2-arylthienopyridines **42** including 3,6-diamino-2-(3-chlorobenzoyl)-4-(2-chlorophenyl)-thieno[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitrile (**42v**), representing the derivative with the highest inhibitory activity which is currently evaluated in further investigations considering the biological activity on other protein kinases.

Further compounds were prepared by cyclization of 3,6-diamino-4-(2-chlorophenyl)thieno[2,3-*b*]pyridine-2,5-dicarbonitrile (**44d**). Among these, 7-amino-9-(2-chlorophenyl)-4-thioxo-3,4-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidine-8-carbonitrile (**78**), although not revealing selective inhibition of *Pf*GSK-3, represents a new potent inhibitor of mammalian GSK-3 showing an IC₅₀-value of 60 nM.

Compounds **51-55** were prepared via alkylation of thioxopyridines, thioxotetrahydroquinolines and -tetrahydronaphthyridines without subsequent Thorpe-Ziegler-cyclization and turned out to be inhibitors of isolated RET tyrosine kinase.

**51****52:** X = CH₂**52a:** Ar = 3-Thienyl, R = H**53:** X = N-CH₃**54****55****55f:** Ar = 3-Thienyl, R = 4-Cl

Selected members were tested additionally for growth inhibition activity against selected cancer cell lines and for selectivity concerning the inhibition of RET compared to other tyrosine kinases like ALK and ABL.

Pyridine **55f** stood out due to remarkably inhibition of RET with an IC_{50} -value in the nanomolar range.

Compound **52a** from the class of tetrahydroquinolines exhibited lower inhibitory activity on isolated RET, but showed a higher selectivity for RET over ALK and ABL compared to **55f**.

9 Experimenteller Teil

9.1 Allgemeines

Analytische Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

La Chrom Elite, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt: Pump L-2130 mit Degasser; Autosampler L-2200; Diode Array Detector L-2450; OrganizerBox L-2000; Trennsäule Merck LiChroCART 125-4, LiChrosphere 100 RP-18 (5 μ m).

Probenvorbereitung: Von der zu vermessenden Verbindung werden ca. 1 mg in 1000 μ l DMSO 99.7% gelöst. 400 μ l dieser Stammlösung werden mit 600 μ l DMSO erneut verdünnt. Die gemessene Absorption der intensivsten Peaks soll im Maximum zwischen 300 und 800 mAU liegen. Gegebenenfalls wird eine konzentriertere bzw. verdünntere Lösung hergestellt. Die verdünnte Lösung wird durch einen Acrodisc® MHP 13 μ M-Filter filtriert.

Elution: Injektionsvolumen: 10 μ l; isokratische Elution; Flussrate: 1.000 ml/min; Gesamtlaufzeit: 15 min; die Gesamtretentionszeit ($t_N + t_M$) soll zwischen 3 und 7 Minuten liegen.

Elutionsmittel: Gemische aus ACN mit H₂O (bidest.) oder (Et₃NH)₂SO₄-Puffer (pH 2.5) im angegebenen Verhältnis; Herstellung des Puffers: 20 ml Triethylamin und 242 mg Natriumhydroxid werden in bidestilliertem Wasser zu 1000 ml gelöst und mit konz. Schwefelsäure auf pH 2.5 eingestellt.

Detektion: Dioden-Array-Detektor bei 254 und 280 nm.

Auswertung: 100%-Methode; Integrationsausschluss 1.55 min, Threshold 500, Bestimmung der Nettoretentionszeit (t_N) und Totzeit (t_M) in Minuten bezogen auf DMSO; Absorptionsmaxima (λ_{\max}) werden aus den mittels DAD gewonnenen UV-Spektren entnommen; verwendete Software: EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3.

Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigfolien Polygram® Sil G/UV₂₅₄, 40 x 80 mm, 0.2 mm Kieselgelschicht mit Fluoreszenzindikator, Fa. Macherey-Nagel, Düren. Detektion bei 254 und 366 nm. Als Elutionsmittel werden Gemische aus Petrolether oder Toluol mit Ethylacetat, reines Ethylacetat oder Ethylacetat/Ethanol-Gemische verwendet.

Elementaranalytik

CE Instruments Flash EA[®] 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest, San Jose, CA, USA; Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

IR-Spektrometrie

Thermo Nicolet FT-IR 200, Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA; Vermessung der Substanzen als KBr-Presslinge.

Das Signal der Carbonylgruppe der Verbindungen **41**, **42**, **43** und **45** ist zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben, da es sich um vinyloge Amide handelt, bei denen zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können.¹⁷² Die Signale fallen mit den C=C-Valenzschwingungen des Aromaten zusammen, so dass eine eindeutige Zuordnung der C=O-Schwingung häufig nicht möglich ist.

Kernresonanzspektroskopie

Bruker Avance II-300 (¹H-NMR-Messung mit 300 MHz), Bruker Avance DRX-400 (¹H-NMR-Messung: 400 MHz, ¹³C-NMR-Messung: 100.6 MHz), Bruker Avance II-600 (¹H-NMR-Messung: 600 MHz, ¹³C-NMR-Messung: 150.9 MHz), Fa. Bruker, Billerica, MA, USA, (NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der Technischen Universität Braunschweig).

Lösungsmittel: DMSO-*d*₆ oder CDCl₃.

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS); Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der δ_{TMS} -Skala.

¹H-NMR-Spektren: Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration, Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, m = Multiplett, br = verbreitertes Signal; scheinbare Multiplizitäten, die nicht direkt aus der Struktur unter Anwendung der Regeln für Spektren erster Ordnung abgeleitet werden können, werden in Anführungsstrichen angegeben.

¹³C-NMR-Spektren: Der Zusatz (2 C) verweist auf ein überlagertes Signal zweier magnetisch äquivalenter ¹³C-Kohlenstoffatome. Die Spektren wurden ¹H-breitband-entkoppelt aufgenommen. Zusätzlich wurde eine ¹³C-DEPT135-Messung durchgeführt.

Massenspektrometrie

Finnigan-MAT 95, Finnigan MAT GmbH, Bremen, (Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Braunschweig); Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisations-

energie: 70 eV; Elektrospray-Ionisation (ESI)-MS; hochaufgelöste Massenspektren (HRMS): Interner Massenstandard: Perfluorkerosin.

Mikrowellen-Synthese

CEM Fokussiertes Mikrowellen™ Synthese System, Typ Discover; ChemDriver™ Application Software Program; Reaktionsgefäße: 10 ml mit Teflonseptum (geschlossenes System), Fa. CEM GmbH, Kamp-Lintfort; Jun-Air Kompressor; Blue Line Model 4, Fa. Jun-Air International, Nørresundby, Dänemark.

Präparative Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

LaPrep, Fa. Merck, Darmstadt: LaPrep P110 Preparative HPLC Pump; Probenschleife der Firma Knauer, Berlin (maximales Injektionsvolumen 5 ml); LaPrep P216 Fraction Collector; LaPrep P311 Spectralphotometer.

Säulenrohr: Länge 125 mm, Innendurchmesser 25 mm, Säule gepackt mit Selbstfüllstand NW25, Säulenmaterial: LiChrospher® 100 RP-18, 12 µm, Fa. Merck, Darmstadt.

Probenvorbereitung: ca. 25 mg Substanz werden in 1 ml DMSO gelöst und in die Probenschleife injiziert.

Elutionsmittel: ACN/H₂O-Gemische, Flussrate: 40 ml/min, Detektion bei 254 nm.

Software: LaPrep/WellChrom für EZChrom, Version 3.1.2.

Röntgenkristallstruktur-Analyse

Die Röntgenkristallstruktur-Analysen wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Peter G. Jones (Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig) angefertigt.

Datensammlung: Die Kristalle wurden in Inertöl auf Glasfäden montiert, in den Kaltgasstrom des Diffraktometers (Bruker SMART 1000 CCD, Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Technischen Universität Braunschweig) gebracht und mit monochromatisierter Mo-K α -Strahlung vermessen.

Strukturauflösung: direkte Methoden.

Strukturverfeinerung und weitere numerische Einzelheiten: siehe Kapitel 9.2 Synthesen und analytische Daten (Röntgenographische Daten).

Säulenchromatographie

Kieselgel 60 (unter 0.063 mm), Fa. Merck, Darmstadt; Säulendurchmesser 2 cm; zum Packen der Säule wird das Kieselgel im Elutionsmittel aufgeschlämmt, Elutionsmittel sind in Kapitel 9.2 für die entsprechenden Verbindungen angegeben.

Schmelzpunktbestimmung

Electrothermal IA 9100, Fa. Barnstedt International, Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien

Bezug der Ausgangsmaterialien

Acros Organics, Geel, Belgien: Phenacylbromide, 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)-acetamid, Chloracetonitril, Cyanthioacetamid, N-Methyl-4-piperidon, Benzaldehyd-Derivate (bis auf die unten angeführten), Benzylbromide (bis auf die unten angeführten), Thiophenol

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA: 4-Methoxybenzylbromid, 2-Fluorbenzaldehyd, 2,6-Dichlorbenzaldehyd, Malonsäuredinitril

TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien: 4-Chlorbenzylbromid

Benzaldehyd-Derivate, die flüssig vorliegen (Benzaldehyd, Thiophen-2-carbaldehyd, Thiophen-3-carbaldehyd, 2-Chlor-, 2-Brom, 2-Methyl und 2-Ethoxybenzaldehyd), werden vor Verwendung mit gesättigter Natriumcarbonatlösung gewaschen. Dazu werden jeweils 2 ml Benzaldehyd-Derivat fünfmal mit 3 ml gesättigter Natriumcarbonatlösung ausgeschüttelt.

9.2 Synthesen und analytische Daten

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Synthese der Arylidenmalonsäuredinitrile **58a-c** (Knoevenagel-Reaktion)

Malonsäuredinitril (**57**) (20.8 mmol, 1.37 g) wird in Ethanol (7 ml) gelöst. Nach Zugabe des entsprechenden aromatischen Aldehyds **56** (20.0 mmol) wird Piperidin (3 Tropfen) hinzugefügt und das Gemisch für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Niederschlag abgesaugt und ohne weitere Reinigung in weiteren Synthesen eingesetzt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2): Synthese der 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide **63c-d, k, m** (Knoevenagel-Reaktion)

Cyanthioacetamid (**64**) (1.00 mmol, 100 mg) wird in Ethanol (2 ml) gelöst. Nach Zugabe des entsprechenden aromatischen Aldehyds **56** (1.00 mmol) wird Triethylamin (1 Tropfen) zugefügt und das Gemisch 30 min bei 40-50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Niederschlag abgesaugt und aus Ethanol 96% umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3): Synthese der 2-Amino-4-aryl-6-(phenylsulfanyl)-pyridin-3,5-dicarbonitrile **61a-b**

Methode a: Das entsprechende Arylidenmalonsäuredinitril **58** (10.0 mmol) wird in Ethanol (10 ml) gelöst. Nach Zugabe von Malonsäuredinitril (**57**) (10.0 mmol, 661 mg), Thiophenol (**59**) (10.0 mmol, 1.02 ml) und Triethylamin (50 µl) wird das Gemisch für 4 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Niederschlag abgesaugt und ohne weitere Reinigung für weitere Synthesen eingesetzt.

Methode b: Zu einer Lösung des entsprechenden aromatischen Aldehyds **56** (1.50 mmol) und Malonsäuredinitril (**57**) (3.10 mmol, 205 mg) in Ethanol (5 ml) wird Triethylamin (0.10 mmol, 13.9 µl) gegeben. Das Gemisch wird auf 50 °C erwärmt und Thiophenol (**59**) (1.60 mmol, 248 µl) zugefügt. Anschließend wird für 2.5 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen

auf Raumtemperatur wird der Niederschlag abgesaugt und ohne weitere Reinigung für weitere Synthesen eingesetzt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV 4): Synthese der 6-Amino-4-aryl-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile **62a-l** und des Thiopyrans **69**

Der entsprechende aromatische Aldehyd **56** (1.00 mmol), Malonsäuredinitril (**57**) (1.00 mmol, 66.1 mg) und Cyanthioacetamid (**64**) (1.00 mmol, 100 mg) werden in Ethanol (4 ml) gelöst. Nach Zugabe von Piperidin (50 µl) wird das Gemisch für 3 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wird mit 6 Tropfen Essigsäure, Wasser (10 ml) und Dichlormethan (2 ml) versetzt, anschließend wird das Gemisch für kurze Zeit geschüttelt. Bildet sich nicht sofort ein Niederschlag, wird das Gemisch einige Zeit bei 2-5 °C gelagert. Der Niederschlag wird abgesaugt und ohne Reinigung für weitere Synthesen eingesetzt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV 5): Synthese der 4-Aryl-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitrile **72c-d, k**

Cyclohexanon (**70**) (0.500 mmol, 51.8 µl) wird in Dioxan (1 ml) gelöst und mit einer katalytischen Menge an Piperidin (1 Tropfen) versetzt. Das Gemisch wird auf 80 °C erwärmt und das entsprechende 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamid **63** (0.500 mmol) wird in kleinen Portionen hinzugegeben. Vor jeder neuen Zugabe wird durch Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie auf vollständige Umsetzung des 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamids **63** überprüft. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Niederschlag abgesaugt. Ist nach Abkühlen kein Niederschlag entstanden, wird das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand oder der abgesaugte Niederschlag wird aus Ethanol (96%) umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV 6): Synthese der 3,6-Diamino-2-aryl-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitrile **41** und **42**, 3,6-Diamino-4-aryl-*N*-(4-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carboxamide **43**, 3,6-Diamino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitrile **44** und [3-Amino-4-aryl-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]chinolin-2-yl](aryl)methanone **45**

Das entsprechende 6-Amino-4-aryl-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril **62** (0.400 mmol) oder 4-Aryl-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril **72** (0.400 mmol) wird in Dimethylformamid (0.5 ml) gelöst. Zu dem Gemisch wird 10%ige Kaliumhydroxid-Lösung (224 µl) gegeben. Nach einer Minute wird das entsprechende Phenacylbromid **74a-n**, 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (**75**) oder Chloracetonitril (**76**) (jeweils 0.400 mmol) hinzugegeben. Das Gemisch wird 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird nochmals 10%ige Kaliumhydroxid-Lösung (224 µl) zugefügt und das Gemisch anschließend solange bei Raumtemperatur gerührt, bis sich laut Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie das Zwischenprodukt komplett umgesetzt hat. Nach Zugabe von Wasser (5 ml) wird der Niederschlag abgesaugt, mit viel Wasser, wenig Ethanol 70% und Petrolether gewaschen. Die Reinigung erfolgt entweder durch Umkristallisation oder Säulenchromatographie mit den angegebenen Lösungs- bzw. Elutionsmitteln.

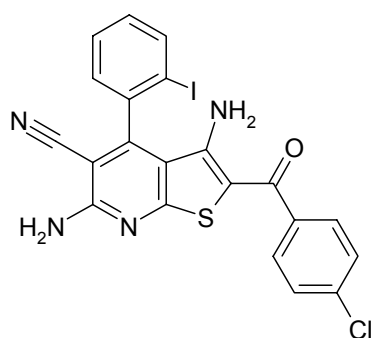
Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV 7): Synthese der 4-Aryl-2-(benzylsulfanyl)-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-3-carbonitrile **51**, 4-Aryl-2-[(2-oxoethyl)sulfanyl]-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-3-carbonitrile **52**, des 2-[[2-(4-Chlorphenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl]-6-methyl-4-(3-thienyl)-5,6,7,8-tetrahydro[1,6]naphthyridin-3-carbonitrils **53**, der 2-Amino-4-aryl-6-(alkylsulfanyl)pyridin-3,5-dicarbonitrile **54** und 2-Amino-4-aryl-6-[2-aryl-2-oxoethyl]sulfanylpyridin-3,5-dicarbonitrile **55**

Das entsprechende 6-Amino-4-aryl-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril **62**, 4-Aryl-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril **72** oder 6-Methyl-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydro[1,6]naphthyridin-3-carbonitril (**73**) (jeweils 0.400 mmol) wird in Dimethylformamid (0.5 ml) gelöst. Nach Zugabe von 10%iger Kaliumhydroxidlösung (224 µl) wird eine Minute gewartet, bevor das entsprechende Benzylbromid **103**, Phenacylbromid **74** oder 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (**75**) (jeweils 0.400 mmol) hinzugefügt wird. Das Gemisch wird 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Wasser (5 ml) wird der Niederschlag abgesaugt und mit viel Wasser und wenig Petrolether

gewaschen. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus dem angegebenen Lösungsmittel.

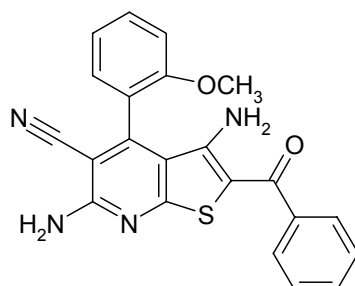
Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 (AAV 8): Synthese der 3,6-Diamino-2,4-diaryl-2H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbonitrile **46** und des 2-Amino-4-(4-chlorphenyl)-6-[(*E*)-phenyldiazenyl]pyridin-3,5-dicarbonitrils (**102**)

Zu einer Lösung des entsprechenden 3-Arylcyclopropan-1,1,2,2-tetracarbonitrils **93** (1.00 mmol) in Methanol (3.0 ml) wird das entsprechende Phenylhydrazin **94** (1.50 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgedampft und der Rückstand wird in 90%igem Methanol mit 1% Natriumhydroxid (12 ml) für 2 h gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

3,6-Diamino-2-(4-chlorbenzoyl)-4-(2-iodphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**41**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-iodphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62c**) (91.5 mg, 0.242 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 136 μ l, 0.484 mmol) und 2-Brom-1-(4-chlorphenyl)ethanon (60.1 mg, 0.257 mmol). Reaktionsdauer: 40 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 53.1 mg (41%) eines gelben Pulvers.

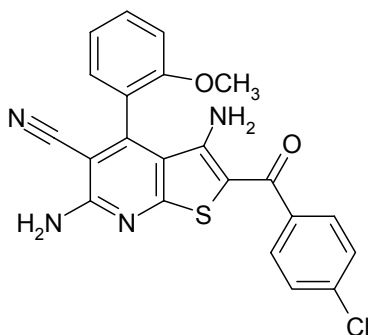
Schmp.: 358-361 °C (Lit.: 325-326 °C)¹⁰³; IR (KBr): 3463 cm^{-1} , 3305 cm^{-1} und 3208 cm^{-1} (NH), 2214 cm^{-1} (C \equiv N), 1623 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 6.25 (br s, 2 H, NH₂), 7.40 („dt“, 1 H, J = 7.9/1.5 Hz, ArH), 7.58-7.59 (m, 3 H, ArH), 7.68-7.72 (m, 3 H, ArH), 7.81 (br s, 2 H, NH₂), 8.15 (d, 1 H, J = 7.9 Hz, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 128.5 (2 C), 128.7, 128.9 (2 C), 129.3, 131.9, 139.4 (tert. C); 90.6, 97.2, 99.3, 112.1, 114.7, 135.5, 137.9, 150.8, 155.2, 159.2, 166.1, 186.2 (quart. C, 1 C nicht detektiert bei 512 Scans); C₂₁H₁₂ClIN₄OS (530.77); ber. C 47.52, H 2.28, N 10.56, S 6.04; gef. C 47.34, H 2.42, N 10.91, S 5.92; HPLC: 98.9% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm, t_N = 4.98 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max} : 329 nm, 221 nm, 297 nm.

3,6-Diamino-2-benzoyl-4-(2-methoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42a**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62b**) (84.1 mg, 0.299 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 μ l, 0.600 mmol) und 2-Brom-1-phenylethanon (59.1 mg, 0.297 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 40.2 mg (34%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 263-264 °C; IR (KBr): 3455 cm⁻¹, 3306 cm⁻¹ und 3200 cm⁻¹ (NH), 2942 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2213 cm⁻¹ (C≡N), 1626 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 6.70 (br s, 2 H, NH₂), 7.22 („dt“, 1 H, *J* = 7.6/0.8 Hz, ArH), 7.34 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 7.41 (dd, 1 H, *J* = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.48-7.55 (m, 3 H, ArH), 7.61 (br s, 2 H, NH₂) überlagert mit 7.62-7.69 (m, 3 H, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.9 (OCH₃); 112.5, 121.3, 127.0 (2 C), 128.4 (2 C), 129.2, 130.8, 132.2 (tert. C); 91.3, 99.6, 113.0, 115.3, 121.4, 141.0, 151.1, 151.2, 155.5, 159.3, 166.0, 187.6 (quart. C); C₂₂H₁₆N₄O₂S (400.45); ber. C 65.98, H 4.03, N 13.99, S 8.01; gef. C 65.79, H 4.08, N 14.24, S 7.71; HPLC: 99.5% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm, *t*_N = 4.24 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max}: 326 nm.

3,6-Diamino-2-(4-chlorbenzoyl)-4-(2-methoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42b**)

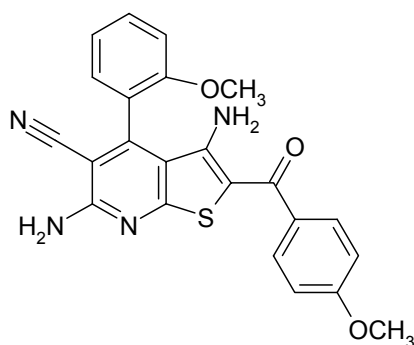


Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62b**) (192 mg, 0.680 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 382 µl, 1.36 mmol) und 2-Brom-1-(4-chlorphenyl)ethanon (159 mg, 0.680 mmol). Reaktionsdauer: 6 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 136 mg (46%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 317-319 °C; IR (KBr): 3461 cm⁻¹, 3308 cm⁻¹ und 3205 cm⁻¹ (NH), 2213 cm⁻¹ (C≡N), 1622 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.80 (s, 3 H, OCH₃), 6.71 (br s, 2 H, NH₂), 7.22 („t“, 1 H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.34 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 7.40 (dd, 1 H, *J* = 7.6/1.5 Hz, ArH), 7.56-7.59 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.62-7.67 (m, 3 H, NH₂ und ArH überlagert), 7.69-7.72 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.9 (OCH₃); 112.5, 121.4, 128.6 (2 C), 129.0 (2 C), 129.2, 132.3 (tert. C); 91.4, 99.4, 112.9, 115.2, 121.3, 135.5, 139.6, 151.2, 151.5, 155.5, 159.4, 166.1, 186.2 (quart. C); C₂₂H₁₅ClN₄O₂S (434.90); ber. C 60.76, H

3.48, N 12.88, S 7.37; gef. C 60.41, H 3.48, N 13.24, S 7.39; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm, $t_N = 3.62$ min, $t_M = 1.01$ min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{\max} : 327 nm.

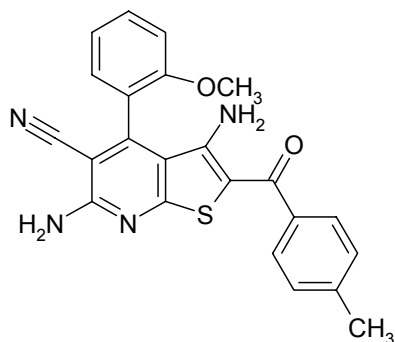
3,6-Diamino-2-(4-methoxybenzoyl)-4-(2-methoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril
(42c)



Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62b**) (84.8 mg, 0.300 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 μ l, 0.600 mmol) und 2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)ethanon (68.7 mg, 0.300 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 83.4 mg (65%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 245-247 °C; IR (KBr): 3458 cm^{-1} , 3325 cm^{-1} und 3210 cm^{-1} (NH), 2932 cm^{-1} und 2841 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2214 cm^{-1} (C \equiv N), 1620 cm^{-1} (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.80 (s, 3 H, OCH₃), 3.83 (s, 3 H, OCH₃), 6.64 (br s, 2 H, NH₂), 7.03-7.06 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.21 („dt“, 1 H, $J = 7.6/1.0$ Hz, ArH), 7.33 (d, 1 H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.40 (dd, 1 H, $J = 7.6/1.8$ Hz, ArH), 7.56 (br s, 2 H, NH₂), 7.64 (ddd, 1 H, $J = 7.6/1.8/1.0$ Hz, ArH), 7.68-7.72 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.4 (OCH₃), 55.9 (OCH₃); 112.5, 113.7 (2 C), 121.3, 129.2 (2 C), 129.2, 132.2 (tert. C); 91.3, 99.5, 113.1, 115.3, 121.5, 133.3, 150.9, 151.0, 155.6, 159.2, 161.4, 165.8, 186.8 (quart. C); C₂₃H₁₈N₄O₃S (430.48); ber. C 64.17, H 4.21, N 13.01, S 7.45; gef. C 64.04, H 4.23, N 13.13, S 7.31; HPLC: 96.5% bei 254 nm und 97.9% bei 280 nm, $t_N = 4.76$ min, $t_M = 1.01$ min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{\max} : 328 nm, 290 nm.

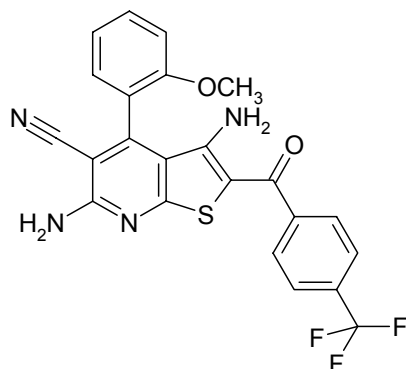
3,6-Diamino-4-(2-methoxyphenyl)-2-(4-methylbenzoyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril
(42d)



Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62b**) (56.5 mg, 0.200 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 µl, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-(4-methylphenyl)ethanon (43.0 mg, 0.202 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 13.1 mg (16%) eines braungelben Pulvers.

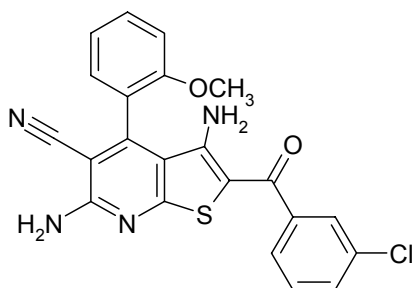
Schmp.: 245-246°C; IR (KBr): 3462 cm⁻¹, 3313 cm⁻¹ und 3207 cm⁻¹ (NH), 2938 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2213 cm⁻¹ (C≡N), 1620 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.37 (s, 3 H, CH₃), 3.80 (s, 3 H, OCH₃), 6.66 (br s, 2 H, NH₂), 7.21 („dt“, 1 H, *J* = 7.6/1.0 Hz, ArH), 7.30-7.34 (m, 3 H, ArH), 7.40 (dd, 1 H, *J* = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.56-7.61 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems und s, 2 H, NH₂; überlagert), 7.64 (ddd, 1 H, *J* = 7.6/1.8/1.0 Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 21.0 (CH₃), 55.9 (OCH₃); 112.5, 121.3, 127.1 (2 C), 128.9 (2 C), 129.2, 132.2 (tert. C); 91.3, 99.7, 113.0, 115.3, 121.4, 138.2, 140.9, 151.0, 151.1, 155.5, 159.3, 165.9, 187.5 (quart. C); C₂₃H₁₈N₄O₂S (414.48); ber. C 66.65, H 4.38, N 13.52, S 7.74; gef. C 64.00, H 4.30, N 13.84, S 6.96; MS (EI): *m/z* (%) = 414 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M-H]⁺ ber. 413.1072; gef. 413.1072; HPLC: 97.5% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm, *t*_N = 4.19 min, *t*_M = 1.01 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max}: 326 nm.

3,6-Diamino-4-(2-methoxyphenyl)-2-[4-(trifluormethyl)benzoyl]thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42e**)



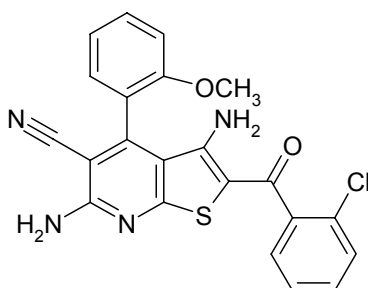
Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62b**) (56.4 mg, 0.200 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 µl, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-[4-(trifluormethyl)phenyl]ethanon (54.3 mg, 0.203 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 48.3 mg (52%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 253-254 °C; IR (KBr): 3472 cm⁻¹, 3361 cm⁻¹ und 3220 cm⁻¹ (NH), 2968 cm⁻¹ und 2935 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2220 cm⁻¹ (C≡N), 1628 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 6.79 (br s, 2 H, NH₂), 7.22 („dt“, 1 H, *J* = 7.6/0.8 Hz, ArH), 7.34 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.41 (dd, 1 H, *J* = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.66 (ddd, 1 H, *J* = 7.6/1.8/0.8 Hz, ArH) überlagert mit 7.60-7.77 (br s, 2 H, NH₂), 7.86-7.90 (m, 4 H, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 56.0 (OCH₃); 112.5, 121.4, 125.5 (q, 2 C, ³*J*_{C,F} = 4.0 Hz, C-C-CF₃), 127.8 (2 C), 129.2, 132.3 (tert. C); 91.5, 99.4, 112.8, 115.2, 121.3, 123.9 (q, ¹*J*_{C,F} = 272 Hz, C-C-CF₃), 130.3 (q, ²*J*_{C,F} = 31.7 Hz, C-C-CF₃), 144.5, 151.4, 151.8, 155.5, 159.4, 166.3, 186.0 (quart. C); C₂₃H₁₅F₃N₄O₂S (468.45); ber. C 58.96, H 3.23, N 11.96; gef. C 57.97, H 3.18, N 11.57; MS (EI): *m/z* (%) = 468 [M]⁺ (76); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 468.0868; gef. 468.0863; HPLC: 97.6% bei 254 nm und 98.0% bei 280 nm, *t*_N = 6.61 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max}: 327 nm.

3,6-Diamino-2-(3-chlorbenzoyl)-4-(2-methoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42f**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62b**) (56.4 mg, 0.200 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 µl, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-(3-chlorphenyl)ethanon (46.4 mg, 0.199 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 39.4 mg (45%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 253-256 °C; IR (KBr): 3465 cm⁻¹, 3372 cm⁻¹ und 3301 cm⁻¹ (NH), 3077 cm⁻¹ und 3056 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2936 cm⁻¹ und 2837 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2218 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.80 (s, 3 H, OCH₃), 6.76 (br s, 2 H, NH₂), 7.22 („dt“, 1 H, *J* = 7.6/0.8 Hz, ArH), 7.34 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.40 (dd, 1 H, *J* = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.52-7.56 (m, 1 H, ArH), 7.60-7.67 (m, 6 H, NH₂ und ArH überlagert); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.9 (OCH₃); 112.5, 121.4, 125.6, 126.8, 129.2, 130.5, 130.6, 132.3 (tert. C); 91.4, 99.4, 112.8, 115.2, 121.3, 133.3, 142.7, 151.3, 151.7, 155.5, 159.4, 166.2, 185.6 (quart. C); C₂₂H₁₅ClN₄O₂S (434.90); ber. C 60.76, H 3.48, N 12.88, S 7.37; gef. C 60.41, H 3.54, N 13.15, S 7.12; HPLC: 96.4% bei 254 nm und 97.7% bei 280 nm, *t*_N = 5.57 min, *t*_M = 1.01 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max}: 327 nm.

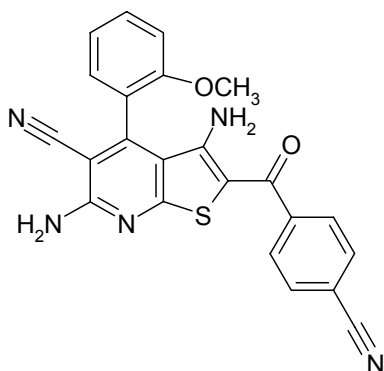
3,6-Diamino-2-(2-chlorbenzoyl)-4-(2-methoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42g**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62b**) (56.9 mg, 0.202 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 µl, 0.400

mmol) und 2-Brom-1-(2-chlorphenyl)ethanon (50.1 mg, 0.215 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 30.7 mg (35%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 260-262 °C; IR (KBr): 3461 cm⁻¹, 3303 cm⁻¹ und 3179 cm⁻¹ (NH), 2933 cm⁻¹ und 2836 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2220 cm⁻¹ (C≡N), 1631 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 7.21 („dt“, 1 H, *J* = 7.6/1.0 Hz, ArH), 7.34 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.42 (dd, 1 H, *J* = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.44-7.52 (m, 3 H, ArH), 7.54-7.57 (m, 1 H, ArH), 7.59-7.67 (m, 3 H, NH₂ und ArH überlagert), 2 H (NH₂) nicht detektiert bei 64 Scans; ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.9 (OCH₃); 112.5, 121.3, 127.4, 128.0, 129.2, 129.7, 131.1, 132.3 (tert. C); 91.4, 101.1, 113.0, 121.3, 129.1, 140.0, 150.8, 151.4, 155.5, 159.3, 166.4, 185.6 (quart. C, 1 C nicht detektiert bei 4992 Scans); C₂₂H₁₅ClN₄O₂S (434.90); ber. C 60.76, H 3.48, N 12.88, S 7.37; gef. C 61.23, H 3.57, N 13.34, S 7.07; MS (EI): *m/z* (%) = 434 [M]⁺ (73); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 434.0604; gef. 434.0607; HPLC: 99.0% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, *t*_N = 2.75 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max}: 321 nm.

3,6-Diamino-2-(4-cyanbenzoyl)-4-(2-methoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42h**)

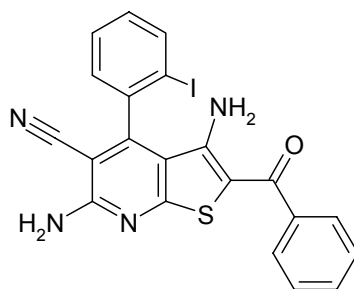


Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62b**) (85.0 mg, 0.301 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 µl, 0.600 mmol) und 4-(Bromacetyl)benzonitril (67.1 mg, 0.299 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 37.9 mg (30%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 338-339 °C; IR (KBr): 3473 cm⁻¹, 3313 cm⁻¹ und 3205 cm⁻¹ (NH), 3093 cm⁻¹ und 3008 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2934 cm⁻¹ und 2835 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2230 und 2215 cm⁻¹ (C≡N), 1619 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.80 (s, 3 H, OCH₃), 6.74 (br s, 2 H, NH₂), 7.22 („dt“, 1 H, *J* = 7.6/0.8 Hz, ArH), 7.34 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz,

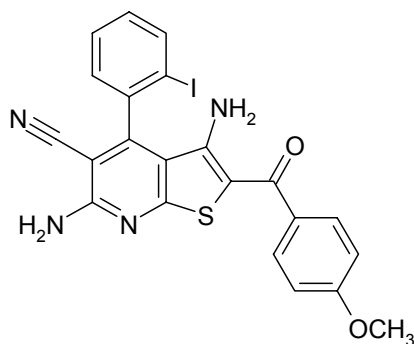
ArH), 7.40 (dd, 1 H, $J = 7.6/1.5$ Hz, ArH), 7.63-7.78 (m, 3 H, NH₂ und ArH überlagert), 7.81-7.83 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.98-9.00 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 56.0 (OCH₃); 112.5, 121.4, 127.8 (2 C), 129.1, 132.3, 132.6 (2 C) (tert. C); 91.5, 99.4, 112.7, 113.1, 115.2, 118.3, 121.2, 144.7, 151.4, 151.9, 155.5, 159.4, 166.3, 185.6 (quart. C); C₂₃H₁₅N₅O₂S (425.46); ber. C 64.93, H 3.55, N 16.46, S 7.54; gef. C 64.54, H 3.62, N 16.95, S 7.23; MS (EI): m/z (%) = 425 [M]⁺ (68); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 425.0947; gef. 425.0942; HPLC: 99.0% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm, $t_N = 3.48$ min, $t_M = 1.01$ min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max} : 328 nm, 246 nm.

3,6-Diamino-2-benzoyl-4-(2-iodphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42i**)



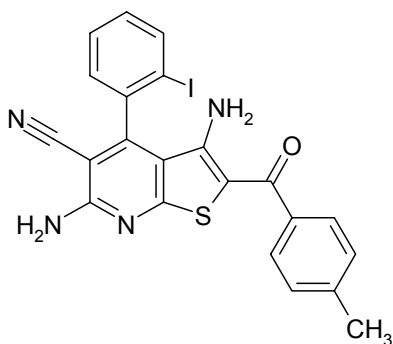
Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-iodphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62c**) (75.6 mg, 0.200 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 μ l, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-phenylethanon (39.8 mg, 0.200 mmol). Reaktionsdauer: 40 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 34.3 mg (35%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 325-326°C; IR (KBr): 3459 cm⁻¹, 3305 cm⁻¹ und 3210 cm⁻¹ (NH), 3051 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2212 cm⁻¹ (C≡N), 1623 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 6.56 (br s, 2 H, NH₂), 7.40 („dt“, 1 H, $J = 7.8/1.5$ Hz, ArH), 7.49-7.57 (m, 3 H, ArH), 7.58 (dd, 1 H, $J = 7.8/1.5$ Hz, ArH), 7.67-7.71 (m, 3 H, ArH), 7.75 (br s, 2 H, NH₂), 8.15 (d, 1 H, $J = 7.8$ Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 127.0 (2 C), 128.5 (2 C), 128.8, 129.4, 130.9, 131.9, 139.5 (tert. C); 90.6, 97.3, 99.7, 112.3, 114.8, 138.1, 140.9, 150.6, 155.2, 159.2, 166.2, 187.8 (quart. C); C₂₁H₁₃IN₄OS (496.33); ber. C 50.82, H 2.64, N 11.29, S 6.46; gef. C 49.77, H 2.69, N 11.10, S 5.93; MS (EI): m/z (%) = 496 [M]⁺ (100); HRMS (EI): m/z [M-H]⁺ ber. 494.9777; gef. 494.9773; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm, $t_N = 3.70$ min, $t_M = 1.02$ min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max} : 328 nm, 222 nm, 297 nm.

3,6-Diamino-4-(2-iodphenyl)-2-(4-methoxybenzoyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42j**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-iodphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62c**) (75.6 mg, 0.200 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 μ l, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)ethanon (45.8 mg, 0.200 mmol). Reaktionsdauer: 40 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 45.2 mg (43%) eines gelben Pulvers.

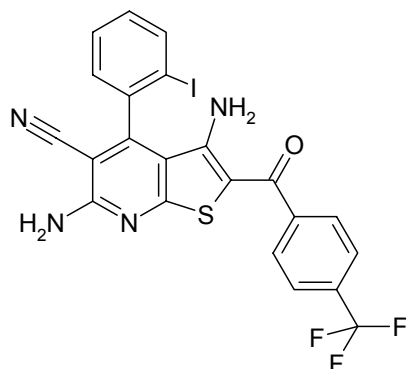
Schmp.: 316-317 °C; IR (KBr): 3462 cm^{-1} , 3305 cm^{-1} und 3199 cm^{-1} (NH), 2930 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2216 cm^{-1} (C \equiv N), 1620 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 3.84 (s, 3 H, OCH₃), 6.50 (br s, 2 H, NH₂), 7.03-7.07 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.39 („dt“, 1 H, J = 7.6/1.5 Hz, ArH), 7.58 (dd, 1 H, J = 7.6/1.5 Hz, ArH), 7.67-7.72 (m, 5 H, NH₂ und ArH, Überlagerung), 8.14 (dd, 1 H, J = 8.1/1.0 Hz, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.4 (OCH₃); 113.7 (2 C), 128.8, 129.2 (2 C), 129.3, 131.9, 139.5 (tert. C); 90.5, 97.3, 99.6, 112.4, 133.2, 138.2, 150.3, 155.0, 159.2, 161.4, 165.9, 186.9 (quart. C, 1 C nicht detektiert bei 960 Scans); C₂₂H₁₅IN₄O₂S (526.35); ber. C 50.20, H 2.87, N 10.64, S 6.09; gef. C 50.33, H 2.97, N 10.80, S 5.83; HPLC: 95.6% bei 254 nm und 97.9% bei 280 nm, t_N = 3.76 min, t_M = 1.01 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max} : 330 nm, 225 nm, 290 nm.

3,6-Diamino-4-(2-iodophenyl)-2-(4-methylbenzoyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42k**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-iodophenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62c**) (75.6 mg, 0.200 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 μ l, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-(4-methylphenyl)ethanon (42.6 mg, 0.200 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Man erhält 57.9 mg (57%) eines gelben Pulvers.

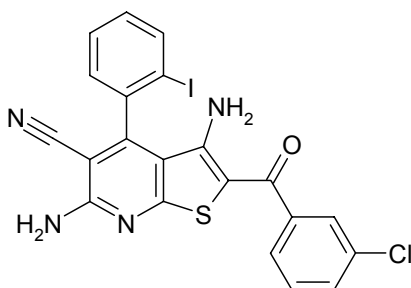
Schmp.: 328-330 °C; IR (KBr): 3465 cm^{-1} , 3311 cm^{-1} und 3209 cm^{-1} (NH), 2213 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1620 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 2.38 (s, 3 H, CH_3), 6.52 (br s, 2 H, NH_2), 7.30-7.32 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.40 („dt“, 1 H, J = 7.8/1.8 Hz, ArH), 7.57-7.62 (m, 3 H, ArH), 7.69 („dt“, 1 H, J = 7.6/1.0 Hz, ArH) überlagert mit 7.73 (s, 2 H, NH_2), 8.14 (dd, 1 H, J = 8.1/1.0 Hz, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 21.0 (CH_3); 127.1 (2 C), 128.8, 129.0 (2 C), 129.4, 131.9, 139.4 (tert. C); 90.6, 97.3, 99.7, 112.4, 114.8, 138.1, 138.2, 140.9, 150.4, 155.1, 159.2, 166.1, 187.2 (quart. C); $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{IN}_4\text{OS}$ (510.35); ber. C 51.78, H 2.96, N 10.98, S 6.28; gef. C 51.60, H 3.08, N 11.08, S 5.90; HPLC: 98.2% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm, t_{N} = 3.49 min, t_{M} = 1.01 min (ACN/ H_2O ; 60:40), λ_{max} : 328 nm, 221 nm, 293 nm.

3,6-Diamino-4-(2-iodophenyl)-2-[4-(trifluormethyl)benzoyl]thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril
(42I)



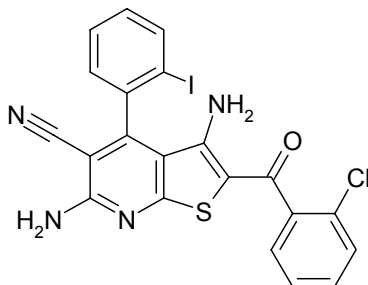
Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-iodophenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62c**) (76.0 mg, 0.201 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 µl, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-[4-(trifluormethyl)phenyl]ethanon (53.9 mg, 0.202 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 45.0 mg (40%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 306-307 °C; IR (KBr): 3471 cm⁻¹, 3317 cm⁻¹ und 3209 cm⁻¹ (NH), 2215 cm⁻¹ (C≡N), 1619 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 6.64 (br s, 2 H, NH₂), 7.41 („dt“, 1 H, *J* = 7.8/1.8 Hz, ArH), 7.59 (dd, 1 H, *J* = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.70 („dt“, 1 H, *J* = 7.6/1.0 Hz, ArH), 7.82 (br s, 2 H, NH₂), 7.89 (s, 4 H, ArH), 8.15 (dd, 1 H, *J* = 7.8/1.0 Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 125.6 (q, 2 C, ³*J*_{C,F} = 4.0 Hz, C-C-CF₃), 127.9 (2 C), 128.8, 129.4, 132.0, 139.5 (tert. C); 90.8, 97.2, 99.5, 112.1, 114.7, 124.1, 138.0, 149.0, 151.2, 159.4, 166.4, 186.1 (quart. C, 2 C nicht detektiert bei 1920 Scans); C₂₂H₁₂F₃IN₄OS (564.32); ber. C 46.82, H 2.14, N 9.93; gef. C 46.56, H 2.19, N 9.12; MS (EI): *m/z* (%) = 564 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M-H]⁺ ber. 562.9651; gef. 562.9648; HPLC: 98.1% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm, *t*_N = 4.93 min, *t*_M = 1.01 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 329 nm, 224 nm, 299 nm.

3,6-Diamino-2-(3-chlorbenzoyl)-4-(2-iodphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42m**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-iodphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62c**) (75.7 mg, 0.200 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 µl, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-(3-chlorphenyl)ethanon (47.1 mg, 0.202 mmol). Reaktionsdauer: 3.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 47.6 mg (45%) eines gelben Pulvers.

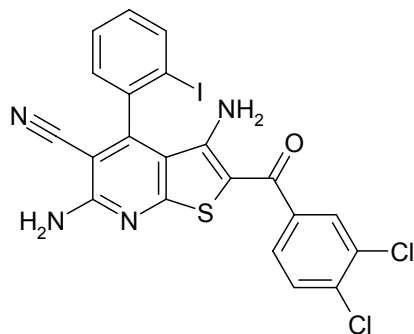
Schmp.: 275-277 °C; IR (KBr): 3474 cm⁻¹ und 3386 cm⁻¹ (NH), 2217 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 6.60 (br s, 2 H, NH₂), 7.41 („dt“, 1 H, *J* = 7.9/1.7 Hz, ArH), 7.54-7.56 (m, 1 H, ArH), 7.59 (dd, 1 H, *J* = 7.5/1.7 Hz, ArH), 7.62-7.63 (m, 1 H, ArH), 7.65-7.68 (m, 2 H, ArH), 7.69 („dt“, 1 H, *J* = 7.5/1.0 Hz, ArH), 7.82 (br s, 2 H, NH₂), 8.15 (dd, 1 H, *J* = 7.9/1.0 Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 125.5, 126.7, 128.7, 129.3, 130.4, 130.6, 131.9, 139.4 (tert. C); 90.6, 97.2, 99.3, 112.0, 114.6, 133.2, 137.9, 142.6, 151.0, 155.2, 159.2, 166.2, 185.7 (quart. C); C₂₁H₁₂ClIN₄OS (530.77); ber. C 47.52, H 2.28, N 10.56, S 6.04; gef. C 47.30, H 2.41, N 10.68, S 5.70; HPLC: 97.9% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm, *t*_N = 4.99 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max}: 328 nm.

3,6-Diamino-2-(2-chlorbenzoyl)-4-(2-iodphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42n**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-iodphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62c**) (62.1 mg, 0.164 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 92 µl, 0.328 mmol) und 2-Brom-1-(2-chlorphenyl)ethanon (38.4 mg, 0.165 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 18.9 mg (22%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 288-289 °C; IR (KBr): 3471 cm⁻¹ und 3388 cm⁻¹ (NH), 2216 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 7.41 („dt“, 1 H, *J* = 7.7/1.7 Hz, ArH), 7.44-7.46 (m, 1 H, ArH), 7.49-7.52 (m, 2 H, ArH), 7.55-7.57 (m, 1 H, ArH), 7.61 (dd, 1 H, *J* = 7.5/1.7 Hz, ArH), 7.69 („dt“, 1 H, *J* = 7.5/1.1 Hz, ArH), 7.81 (br s, 2 H, NH₂), 8.16 (dd, 1 H, *J* = 7.9/0.9 Hz, ArH), 2 H (NH₂) nicht detektiert bei 64 Scans; ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 126.8, 127.4, 128.2, 128.8, 129.2, 130.6, 131.4, 139.3 (tert. C); 90.1, 96.7, 100.5, 111.7, 114.1, 128.5, 137.4, 138.9, 149.6, 154.9, 158.7, 165.9, 185.1 (quart. C); C₂₁H₁₂ClIN₄OS (530.77); ber. C 47.52, H 2.28, N 10.56, S 6.04; gef. C 47.97, H 2.49, N 10.58, S 5.85; MS (EI): *m/z* (%) = 530 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 529.9465; gef. 529.9485; HPLC: 98.8% bei 254 nm und 98.7% bei 280 nm, *t*_N = 4.49 min, *t*_M = 1.01 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max}: 325 nm.

3,6-Diamino-2-(3,4-dichlorbenzoyl)-4-(2-iodphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42o**)

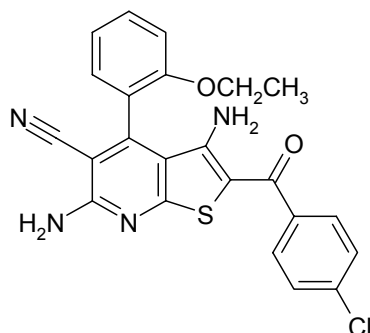


Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-iodphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62c**) (75.6 mg, 0.200 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 µl, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-(3,4-dichlorphenyl)ethanon (53.7 mg, 0.200 mmol). Reaktionsdauer: 40 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 18.1 mg (16%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 286-289 °C; IR (KBr): 3473 cm⁻¹ und 3388 cm⁻¹ (NH), 2216 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 6.56 (br s, 2 H, NH₂), 7.41 („dt“, 1 H, *J* = 7.9/1.7 Hz, ArH), 7.58 (dd, 1 H, *J* = 7.5/1.7 Hz, ArH), 7.69 (dd, 1 H, *J* = 8.3/2.1 Hz, ArH), 7.70 („dt“, 1 H, *J* = 7.5/1.1 Hz, ArH), 7.80 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 7.84 (br s, 2 H, NH₂), 7.90 (d, 1 H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 8.16 (dd, 1 H, *J* = 7.9/1.1 Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 127.2, 128.7, 129.1, 129.4, 130.8, 131.9, 139.5 (tert. C); 90.7, 97.2, 99.2, 112.0, 114.6, 131.4, 133.5, 137.9, 140.9, 151.2, 155.3, 159.3, 166.3, 184.5 (quart. C); C₂₁H₁₁Cl₂IN₄OS (565.21); ber. C 44.62, H 1.96, N 9.91, S 5.67; gef. C 44.81, H 2.14, N 10.12, S 5.67;

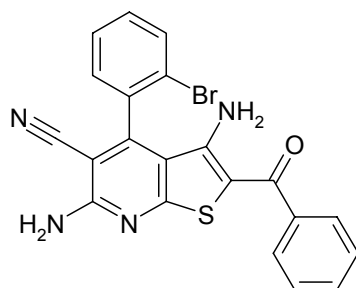
HPLC: 99.3% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, $t_N = 4.72$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{\max} : 330 nm, 299 nm.

3,6-Diamino-2-(4-chlorbenzoyl)-4-(2-ethoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42p**)



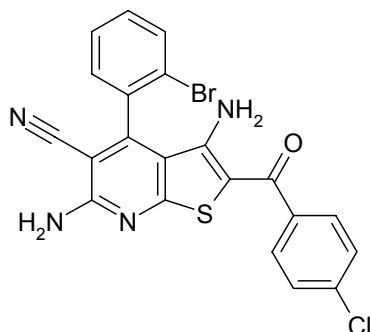
Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-ethoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62g**) (88.9 mg, 0.300 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 μ l, 0.600 mmol) und 2-Brom-1-(4-chlorphenyl)ethanon (70.0 mg, 0.300 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 67.3 mg (50%) eines braunen Pulvers.

Schmp.: 256-257 °C; IR (KBr): 3462 cm^{-1} , 3300 cm^{-1} und 3208 cm^{-1} (NH), 2973 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2215 cm^{-1} (C \equiv N), 1620 cm^{-1} (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.18 (t, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH₃), 4.14 (q, 2 H, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 6.78 (br s, 2 H, NH₂), 7.19 („t“, 1 H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.32 (d, 1 H, $J = 8.3$ Hz, ArH), 7.39 (dd, 1 H, $J = 7.6/1.5$ Hz, ArH), 7.57-7.63 (m, 5 H, ArH und NH₂), 7.69-7.71 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 14.3 (CH₃); 64.0 (CH₂); 113.5, 121.2, 128.6 (2 C), 129.0 (2 C), 129.3, 132.2 (tert. C); 91.4, 99.3, 112.9, 115.3, 121.6, 135.5, 139.6, 151.3, 151.6, 154.8, 159.4, 166.1, 186.1 (quart. C); C₂₃H₁₇ClN₄O₂S (448.93); ber. C 61.53, H 3.82, N 12.48, S 7.14; gef. C 61.22, H 4.00, N 12.27, S 6.96; HPLC: 98.2% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm, $t_N = 7.38$ min, $t_M = 1.02$ min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{\max} : 327 nm.

3,6-Diamino-2-benzoyl-4-(2-bromphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42q**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-bromphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62d**) (166 mg, 0.500 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 280 μ l, 1.00 mmol) und 2-Brom-1-phenylethanon (99.5 mg, 0.500 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 86.0 mg (38%) eines orangefarbenen Pulvers.

Schmp.: 350-351 °C; IR (KBr): 3462 cm^{-1} und 3336 cm^{-1} (NH), 2213 cm^{-1} (C \equiv N), 1616 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 6.67 (br s, 2 H, NH $_2$), 7.50-7.53 (m, 2 H, ArH), 7.55-7.57 (m, 1 H, ArH), 7.60-7.62 (m, 1 H, ArH), 7.64-7.65 (m, 1 H, ArH), 7.68-7.70 (m, 3 H, ArH), 7.79 (br s, 2 H, NH $_2$), 7.96 (d, 1 H, J = 7.9 Hz, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 125.9 (2 C), 127.4 (2 C), 127.8, 128.7, 129.8, 131.3, 132.3 (tert. C); 89.5, 98.6, 111.2, 113.7, 119.9, 132.8, 139.8, 149.6, 151.1, 158.1, 165.1, 186.7 (quart. C); C $_{21}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{OS}$ (449.32); ber. C 56.13, H 2.92, N 12.47, S 7.14; gef. C 56.46, H 3.04, N 12.76, S 7.18; HPLC: 99.2% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm, t_N = 2.66 min, t_M = 1.03 min (ACN/H $_2$ O: 55:45), λ_{max} : 327 nm.

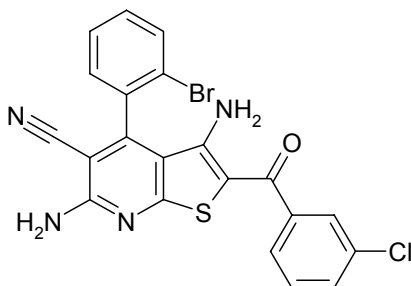
3,6-Diamino-4-(2-bromphenyl)-2-(4-chlorbenzoyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42r**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-bromphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62d**) (133 mg, 0.400 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 224 μ l, 0.800 mmol) und 2-Brom-1-(4-chlorphenyl)ethanon (93.4 mg, 0.400 mmol). Reaktionsdauer: 40 min.

Nach Umkristallisation aus Essigsäure/Ethanol erhält man 54.4 mg (28%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 355-358 °C; IR (KBr): 3464 cm⁻¹, 3324 cm⁻¹ und 3209 cm⁻¹ (NH), 2214 cm⁻¹ (C≡N), 1617 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 6.65 (br s, 2 H, NH₂), 7.57-7.60 (m, 2 H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems, überlagert mit m bei 7.61-7.62 ppm), 7.61-7.62 (m, 1 H, ArH), 7.64 (dd, 1 H, *J* = 7.5/1.7 Hz, ArH), 7.69 („dt“, 1 H, *J* = 7.5/0.9 Hz, ArH, überlagert mit m bei 7.70-7.72 ppm), 7.70-7.72 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.81 (br s, 2 H, NH₂), 7.96 (dd, 1 H, *J* = 8.1/0.8 Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 129.1 (2 C), 129.4, 129.5 (2 C), 130.3, 132.8, 133.9 (tert. C); 91.2, 100.0, 112.7, 115.2, 121.4, 134.3, 136.1, 139.9, 151.4, 152.7, 159.7, 166.7, 186.8 (quart. C); C₂₁H₁₂BrClN₄OS (483.77); ber. C 52.14, H 2.50, N 11.58, S 6.63; gef. C 51.94, H 2.61, N 11.45, S 6.59; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm, *t*_N = 4.65 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 328 nm.

3,6-Diamino-4-(2-bromphenyl)-2-(3-chlorbenzoyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42s**)

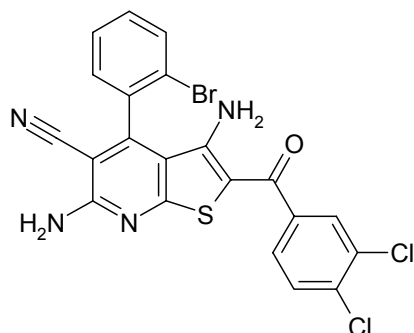


Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-bromphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62d**) (66.3 mg, 0.200 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 µl, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-(3-chlorphenyl)ethanon (46.6 mg, 0.200 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 25.2 mg (26%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 280-283 °C; IR (KBr): 3474 cm⁻¹ und 3369 cm⁻¹ (NH), 2214 cm⁻¹ (C≡N), 1611 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 6.63 (br s, 2 H, NH₂), 7.55 (dd, 1 H, *J* = 7.3/0.8 Hz, ArH), 7.58-7.71 (m, 6 H, ArH), 7.80 (br s, 2 H, NH₂), 7.94-7.97 (m, 1 H, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 125.5, 126.7, 128.9, 129.7, 130.4, 130.6, 132.3, 133.3 (tert. C); 90.7, 99.4, 112.1, 114.6, 120.8, 133.2, 133.7, 142.6, 151.0, 152.3, 159.2, 166.2, 185.7 (quart. C); C₂₁H₁₂BrClN₄OS (483.77); ber. C 52.14, H 2.50, N 11.58, S

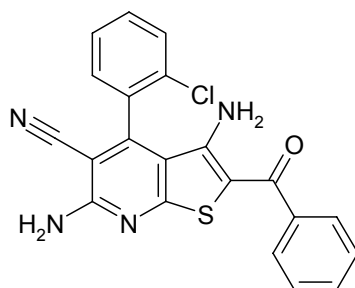
6.63; gef. C 52.33, H 2.76, N 11.56, S 6.67; HPLC: 98.9% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm, t_N = 5.97 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{\max} : 328 nm.

3,6-Diamino-4-(2-bromphenyl)-2-(3,4-dichlorbenzoyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42t**)



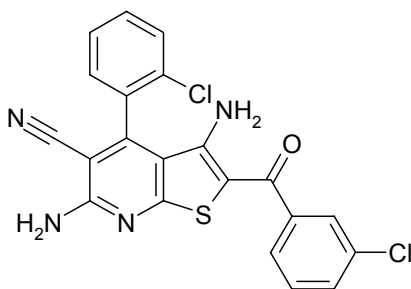
Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-bromphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62d**) (133 mg, 0.401 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 224 μ l, 0.800 mmol) und 2-Brom-1-(3,4-dichlorphenyl)ethanon (107 mg, 0.400 mmol). Reaktionsdauer: 0.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 88.7 mg (43%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 289-290 °C; IR (KBr): 3475 cm^{-1} und 3397 cm^{-1} (NH), 2223 cm^{-1} (C \equiv N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 6.64 (br s, 2 H, NH₂), 7.60-7.70 (m, 4 H, ArH), 7.80 (d, 1 H, J = 8.3 Hz, ArH), 7.84 (br s, 2 H, NH₂, überlagert mit d bei 7.80 ppm und d bei 7.89 ppm), 7.89 (d, 1 H, J = 1.3 Hz, ArH), 7.96 (d, 1 H, J = 7.9 Hz, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 127.1, 128.9, 129.0, 129.7, 130.8, 132.3, 133.3 (tert. C); 90.7, 99.3, 112.0, 114.6, 120.8, 131.4, 133.5, 133.7, 140.9, 151.2, 152.3, 159.2, 166.3, 184.5 (quart. C); C₂₁H₁₁BrCl₂N₄OS (518.21); ber. C 48.67, H 2.14, N 10.81, S 6.19; gef. C 48.56, H 2.33, N 10.91, S 6.17; HPLC: 99.0% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm, t_N = 4.55 min, t_M = 1.04 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{\max} : 329 nm.

3,6-Diamino-2-benzoyl-4-(2-chlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42u**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62e**) (86.2 mg, 0.301 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 µl, 0.600 mmol) und 2-Brom-1-phenylethanon (60.2 mg, 0.302 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 95.2 mg (78%) eines orangefarbenen Pulvers.

Schmp.: 351-353 °C (Lit.¹⁰⁸: 350-352 °C); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 6.56 (br s, 2 H, NH₂), 7.50-7.53 (m, 2 H, ArH), 7.55-7.57 (m, 1 H, ArH), 7.63-7.72 (m, 5 H, ArH), 7.77 (br s, 2 H, NH₂), 7.80-7.82 (m, 1 H, ArH); C₂₁H₁₃ClN₄OS (404.87). Die ¹H-NMR-Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.¹⁰⁸

3,6-Diamino-2-(3-chlorbenzoyl)-4-(2-chlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42v**)

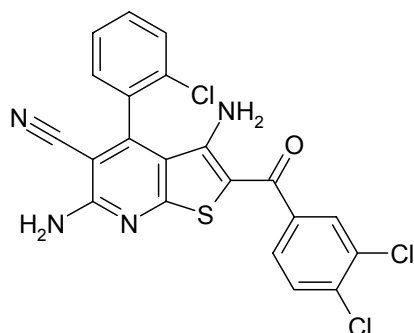
Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62e**) (74.6 mg, 0.260 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 146 µl, 0.520 mmol) und 2-Brom-1-(3-chlorphenyl)ethanon (60.6 mg, 0.260 mmol). Reaktionsdauer: 3.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 42.3 mg (37%) eines orangefarbenen Pulvers.

Schmp.: 289-290 °C; IR (KBr): 3477 cm⁻¹ und 3362 cm⁻¹ (NH), 2216 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 6.69 (br s, 2 H, NH₂), 7.54-7.56 (m, 1 H, ArH), 7.62-7.64 (m, 1 H, ArH), 7.65-7.67 (m, 4 H, ArH), 7.69-7.72 (m, 1 H, ArH), 7.76-7.91 (m, 3 H, NH₂)

und ArH überlagert); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 125.7, 126.9, 128.6, 130.0, 130.4, 130.6, 130.8, 132.5 (tert. C); 90.9, 99.6, 112.4, 114.8, 131.1, 131.8, 133.4, 142.7, 150.8, 151.2, 159.3, 166.4, 185.9 (quart. C); $\text{C}_{21}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$ (439.32); ber. C 57.41, H 2.75, N 12.75, S 7.30; gef. C 57.23, H 2.93, N 12.67, S 7.34; HPLC: 98.0% bei 254 nm und 98.0% bei 280 nm, t_N = 5.39 min, t_M = 1.03 min (ACN/ H_2O ; 55:45), λ_{max} : 328 nm.

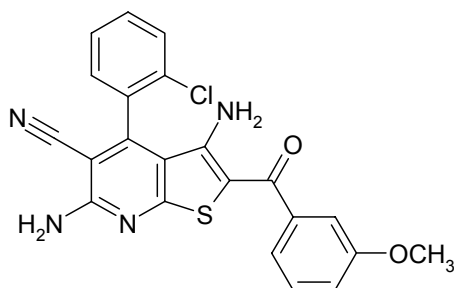
3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)-2-(3,4-dichlorbenzoyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril

(42w)



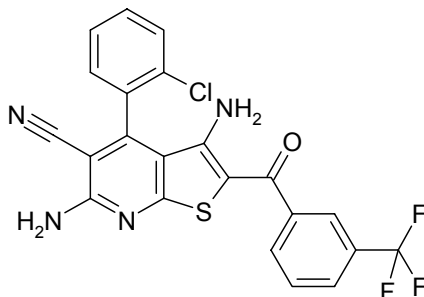
Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62e**) (86.0 mg, 0.300 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 μl , 0.600 mmol) und 2-Brom-1-(3,4-dichlorphenyl)ethanon (80.4 mg, 0.300 mmol). Reaktionsdauer: 40 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 72.9 mg (51%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 273-275 °C; IR (KBr): 3473 cm^{-1} , 3402 cm^{-1} , 3379 cm^{-1} und 3275 cm^{-1} (NH), 2216 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 6.71 (br s, 2 H, NH_2), 7.65-7.66 (m, 2 H, ArH), 7.67-7.72 (m, 2 H, ArH), 7.79-7.87 (m, 4 H, NH_2 und ArH überlagert), 7.89 (d, 1 H, J = 2.1 Hz, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 127.2, 128.5, 129.1, 129.9, 130.3, 130.8, 132.4 (tert. C); 90.8, 99.4, 112.2, 114.7, 130.9, 131.4, 131.6, 133.5, 140.9, 150.7, 151.3, 159.2, 166.3, 184.6 (quart. C); $\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{OS}$ (473.76); ber. C 53.24, H 2.34, N 11.83, S 6.77; gef. C 52.85, H 2.51, N 11.68, S 6.61; HPLC: 98.0% bei 254 nm und 97.6% bei 280 nm, t_N = 3.66 min, t_M = 1.03 min (ACN/ H_2O ; 70:30), λ_{max} : 328 nm.

3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)-2-(3-methoxybenzoyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42x**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62e**) (86.7 mg, 0.302 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 µl, 0.600 mmol) und 2-Brom-1-(3-methoxyphenyl)ethanon (69.9 mg, 0.305 mmol). Reaktionsdauer: 40 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 44.5 mg (34%) eines orangegelben Pulvers.

Schmp.: 224-225 °C; IR (KBr): 3477 cm⁻¹ und 3367 cm⁻¹ (NH), 2216 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 6.66 (br s, 2 H, NH₂), 7.12 (dd, 1 H, *J* = 8.3/2.6 Hz, ArH), 7.18-7.19 (m, 1 H, ArH), 7.26 (d, 1 H, *J* = 7.5 Hz, ArH), 7.43 („t“, 1 H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 7.63-7.67 (m, 2 H, ArH), 7.69-7.72 (m, 1 H, ArH), 7.73-7.93 (m, 3 H, NH₂ und ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.2 (OCH₃); 112.1, 116.7, 119.1, 128.4, 129.7, 129.9, 130.3, 132.3 (tert. C); 90.6, 99.7, 112.4, 114.8, 131.0, 131.8, 142.1, 150.6, 150.7, 159.0, 159.1, 166.2, 187.4 (quart. C); C₂₂H₁₅ClN₄O₂S (434.90); ber. C 60.76, H 3.48, N 12.88, S 7.37; gef. C 60.67, H 3.61, N 13.02, S 7.05; HPLC: 98.1% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm, *t*_N = 2.63 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 328 nm.

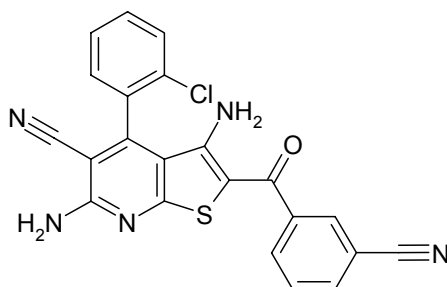
3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)-2-[3-(trifluormethyl)benzoyl]thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42y**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62e**) (86.0 mg, 0.300 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 µl, 0.600 mmol)

und 2-Brom-1-[3-(trifluormethyl)phenyl]ethanon (80.3 mg, 0.301 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 35.2 mg (25%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 255-257 °C; IR (KBr): 3479 cm⁻¹ und 3372 cm⁻¹ (NH), 2218 cm⁻¹ (C≡N), 1610 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 6.70 (br s, 2 H, NH₂), 7.64-7.68 (m, 2 H, ArH), 7.70-7.73 (m, 1 H, ArH), 7.77 („t“, 1 H, *J* = 7.7 Hz, ArH), 7.82 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 7.85 (br s, 2 H, NH₂, überlagert mit t bei 7.77 ppm und d bei 7.82 ppm), 7.94 (d, 1 H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 7.97 (s, 1 H, ArH), 8.02 (d, 1 H, *J* = 7.7 Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 123.7 (q, ³*J*_{C,F} = 3.9 Hz, C-C-CF₃), 127.4 (q, ³*J*_{C,F} = 3.9 Hz, C-C-CF₃), 128.5, 129.8, 129.9, 130.3, 131.0, 132.4 (tert. C); 90.8, 99.4, 112.2, 114.7, 123.8 (q, ¹*J*_{C,F} = 273 Hz, C-C-CF₃), 129.1 (q, ²*J*_{C,F} = 32.1 Hz, C-C-CF₃), 131.0, 131.6, 141.4, 150.8, 151.3, 159.2, 166.3, 185.7 (quart. C); C₂₂H₁₂ClF₃N₄OS (472.87); ber. C 55.88, H 2.56, N 11.85; gef. C 55.23, H 2.39, N 11.27; MS (EI): *m/z* (%) = 472 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M-H]⁺ ber. 471.0294; gef. 471.0280; HPLC: 99.0% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm, *t*_N = 3.31 min, *t*_M = 1.04 min (ACN/H₂O; 65:35), λ_{max}: 327 nm.

3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)-2-(3-cyanbenzoyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42z**)

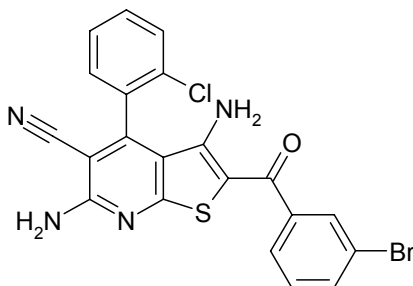


Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62e**) (86.3 mg, 0.301 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 µl, 0.600 mmol) und 3-(Bromacetyl)benzonitril (67.4 mg, 0.301 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 44.2 mg (34%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 303-305 °C; IR (KBr): 3478 cm⁻¹ und 3390 cm⁻¹ (NH), 2217 cm⁻¹ (Doppelpeak, C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 6.71 (br s, 2 H, NH₂), 7.64-7.67 (m, 2 H, ArH), 7.70-7.75 (m, 2 H, ArH), 7.82 (d, 1 H, *J* = 7.9 Hz, ArH, überlagert mit br s bei 7.87 ppm), 7.87 (br s, 2 H, NH₂), 7.99-8.04 (m, 2 H, ArH), 8.10-8.11 (m, 1 H, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 128.4, 129.8, 129.8, 130.3, 130.6, 131.5, 132.3, 134.3

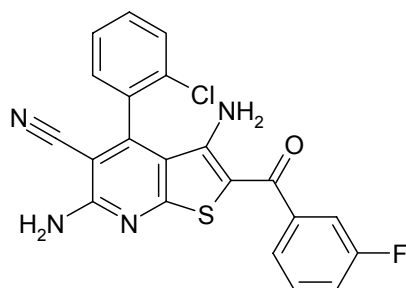
(tert. C); 90.8, 99.4, 111.6, 112.1, 114.7, 118.1, 130.9, 131.6, 141.6, 150.8, 151.3, 159.2, 166.3, 185.2 (quart. C); $C_{22}H_{12}ClN_5OS$ (429.88); ber. C 61.47, H 2.81, N 16.29, S 7.46; gef. C 61.63, H 2.89, N 16.28, S 7.33; HPLC: 97.5% bei 254 nm und 97.6% bei 280 nm, t_N = 2.30 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max} : 328 nm.

3,6-Diamino-2-(3-brombenzoyl)-4-(2-chlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42a'**)



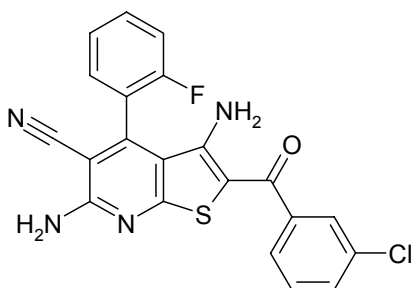
Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62e**) (86.8 mg, 0.303 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 μ l, 0.600 mmol) und 2-Brom-1-(3-bromphenyl)ethanon (83.9 mg, 0.302 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 54.7 mg (38%) eines orangegelben Pulvers.

Schmp.: 267-268 °C; IR (KBr): 3472 cm^{-1} und 3364 cm^{-1} (NH), 2215 cm^{-1} (C \equiv N); 1H -NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 6.67 (br s, 2 H, NH₂), 7.49 („t“, 1 H, J = 7.9 Hz, ArH), 7.64-7.67 (m, 2 H, ArH), 7.69 -7.72 (m, 2 H, ArH), 7.75-7.77 (m, 1 H, ArH), 7.80-7.92 (m, 4 H, ArH und NH₂ überlagert); ^{13}C -NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 125.9, 128.4, 129.6, 129.9, 130.3, 130.7, 132.3, 133.5 (tert. C); 90.7, 99.4, 112.2, 114.7, 121.8, 130.9, 131.6, 142.8, 150.7, 151.1, 159.2, 166.3, 185.7 (quart. C); $C_{21}H_{12}BrClN_4OS$ (483.77); ber. C 52.14, H 2.50, N 11.58, S 6.63; gef. C 52.11, H 2.57, N 11.50, S 6.62; HPLC: 96.6% bei 254 nm und 96.8% bei 280 nm, t_N = 4.95 min, t_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max} : 328 nm.

3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)-2-(3-fluorbenzoyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42b'**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62e**) (70.5 mg, 0.246 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 138 µl, 0.492 mmol) und 2-Brom-1-(3-fluorphenyl)ethanon (53.8 mg, 0.248 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 57.8 mg (56%) eines gelben Pulvers.

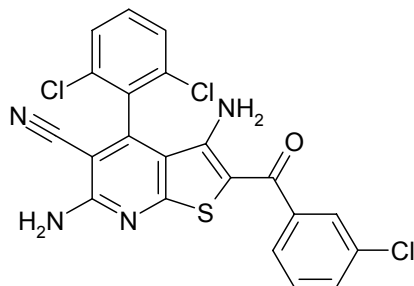
Schmp.: 352-353 °C; IR (KBr): 3471 cm⁻¹ und 3342 cm⁻¹ (NH), 2214 cm⁻¹ (C≡N), 1613 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 6.69 (br s, 2 H, NH₂), 7.39-7.43 (m, 1 H, ArH), 7.45-7.48 (m 1 H, ArH), 7.53-7.59 (m, 2 H, ArH), 7.64-7.68 (m, 2 H, ArH), 7.69-7.72 (m, 1 H, ArH), 7.76-7.93 (m, 3 H, ArH und NH₂ überlagert); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 113.8 (d, ²J_{C,F} = 22.4 Hz, C-C-C-C-F), 117.7 (d, ²J_{C,F} = 21.2 Hz, C-C-C-C-F), 123.1 (d, ⁴J_{C,F} = 2.7 Hz, C-C-C-C-F), 128.4, 129.9, 130.3, 130.7 (d, ³J_{C,F} = 8.2 Hz, C-C-C-C-F), 132.3 (tert. C); 90.7, 99.5, 112.2, 114.7, 130.9, 131.7, 142.9 (d, ³J_{C,F} = 6.4 Hz, C-C-C-C-F), 150.7, 151.1, 159.2, 161.6 (d, ¹J_{C,F} = 245 Hz, C-C-C-C-F), 166.3, 185.9 (quart. C); C₂₁H₁₂ClFN₄OS (422.87); ber. C 59.65, H 2.86, N 13.25; gef. C 59.75, H 2.77, N 12.62; MS (EI): m/z (%) = 421 [M-H]⁺ (100); HRMS (EI): m/z [M-H]⁺ ber. 421.0326; gef. 421.0326; HPLC: 98.5% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm, t_N = 2.59 min, t_M = 1.04 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 327 nm.

3,6-Diamino-2-(3-chlorbenzoyl)-4-(2-fluorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42c'**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-fluorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62f**) (81.3 mg, 0.301 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 µl, 0.600 mmol) und 2-Brom-1-(3-chlorphenyl)ethanon (70.3 mg, 0.301 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 64.7 mg (51%) eines orangegelben Pulvers.

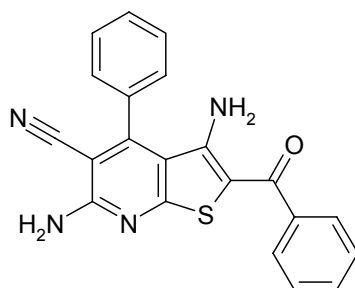
Schmp.: 284-285 °C; IR (KBr): 3474 cm⁻¹ und 3371 cm⁻¹ (NH), 2216 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 6.77 (br s, 2 H, NH₂), 7.49-7.59 (m, 3 H, ArH), 7.62-7.66 (m, 4 H, ArH), 7.72-7.91 (m, 3 H, ArH und NH₂ überlagert); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 116.0 (d, ²J_{C,F} = 20.6 Hz, C-C-C-C-F), 124.8, 124.9 (d, ⁴J_{C,F} = 3.3 Hz, C-C-C-C-F), 126.0, 129.4 (br, keine Kopplungskonstante bestimmbar, C-C-C-C-F), 129.7, 129.9, 132.5 (d, ³J_{C,F} = 8.2 Hz, C-C-C-C-F) (tert. C); 90.4, 98.9, 111.7, 114.1, 119.5 (d, ²J_{C,F} = 16.0 Hz, C-C-C-C-F), 132.5, 141.8, 146.7, 150.5, 157.1 (d, ¹J_{C,F} = 247 Hz, C-C-C-C-F), 158.4, 165.6, 185.1 (quart. C); C₂₁H₁₂ClFN₄OS (422.87); ber. C 59.65, H 2.86, N 13.25; gef. C 59.46, H 2.93, N 12.77; MS (EI): (m/z) (%) = 421 [M-H]⁺ (100); HRMS (EI): m/z [M-H]⁺ ber. 421.0326; gef. 421.0326; HPLC: 97.6% bei 254 nm und 98.8% bei 280 nm, t_N = 3.15 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 328 nm, 296 nm.

3,6-Diamino-2-(3-chlorbenzoyl)-4-(2,6-dichlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril
(42d')



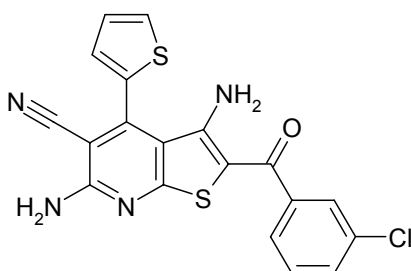
Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2,6-dichlorphenyl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyridin-3,5-dicarbonitril (**68**) (218 mg, 0.677 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 379 μ l, 1.35 mmol) und 2-Brom-1-(3-chlorphenyl)ethanon (158 mg, 0.678 mmol). Reaktionsdauer: 40 min. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Säulendurchmesser 2 cm, Länge 20 cm, Elutionsmittel Toluol/Ethylacetat 4:1) und anschließender Umkristallisation aus Ethanol erhält man 55.0 mg (17%) eines orangefarbenen Pulvers.

Schmp.: 278-279 °C; IR (KBr): 3458 cm^{-1} und 3293 cm^{-1} (NH), 2217 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1635 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 6.79 (br s, 2 H, NH_2), 7.55 („t“, 1 H, J = 7.9 Hz, ArH), 7.62-7.64 (m, 1 H, ArH), 7.67-7.69 (m, 1 H, ArH), 7.71 („t“, 1 H, J = 1.7 Hz, ArH), 7.74 (dd, 1 H, J = 8.8/7.7 Hz, ArH), 7.85 (d, 2 H, J = 7.9 Hz, ArH), 7.94 (br s, 2 H, NH_2); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 125.6, 126.8, 129.4 (2 C), 130.4, 130.7, 133.3 (tert. C); 90.1, 99.8, 111.9, 114.2, 130.2, 132.6 (2 C), 133.3, 142.5, 148.1, 150.7, 159.3, 166.6, 186.0 (quart. C); $\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{OS}$ (473.76); ber. C 53.24, H 2.34, N 11.83, S 6.77; gef. C 53.30, H 2.53, N 11.63, S 6.71; HPLC: 99.7% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm, t_N = 4.01 min, t_M = 1.05 min (ACN/ H_2O ; 60:40), λ_{max} : 329 nm, 296 nm.

3,6-Diamino-2-benzoyl-4-phenylthieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42e'**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-phenyl-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62a**) (74.1 mg, 0.200 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 112 μ l, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-phenylethanon (39.8 mg, 0.200 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Eisessig erhält man 43.3 mg (58%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 350-355 °C (Lit.¹¹⁶: 322-324 °C); IR (KBr): 3458 cm^{-1} , 3357 cm^{-1} und 3265 cm^{-1} (NH), 2213 cm^{-1} (C \equiv N), 1611 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 6.66 (br s, 2 H, NH₂), 7.49-7.59 (m, 5 H, ArH), 7.60-7.78 (m, 7 H, ArH und NH₂ überlagert); C₂₁H₁₄N₄OS (370.43). Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.¹¹⁶

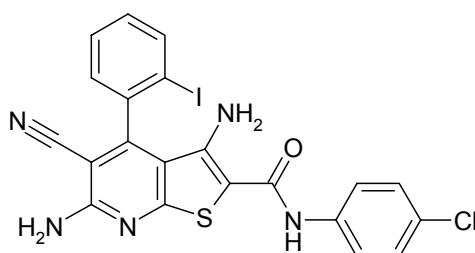
3,6-Diamino-2-(3-chlorbenzoyl)-4-(2-thienyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42f'**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62j**) (129 mg, 0.500 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 280 μ l, 1.00 mmol) und 2-Brom-1-(3-chlorphenyl)ethanon (117 mg, 0.500 mmol). Reaktionsdauer: 45 min. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Säulendurchmesser 2 cm, Länge 30 cm, Elutionsmittel Toluol/Ethylacetat 4:1) erhält man 64.1 mg (31%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 277-279 °C; IR (KBr): 3466 cm^{-1} und 3370 cm^{-1} (NH), 2213 cm^{-1} (C \equiv N), 1608 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 6.94 (br s, 2 H, NH₂), 7.36 (dd, 1 H, J = 5.1/3.6 Hz, Thiophen-H), 7.48 (dd, 1 H, J = 3.6/1.1 Hz, Thiophen-H), 7.55 („t“, 1 H, J = 7.7

Hz, ArH), 7.62-7.66 (m, 3 H, ArH), 7.73 (br s, 2 H, NH₂), 8.03 (dd, 1 H, $J = 5.1/1.1$ Hz, Thiophen-H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 125.5, 126.8, 128.2, 129.8, 130.4, 130.5, 130.6 (tert. C); 92.4, 99.4, 113.0, 114.9, 131.6, 133.3, 142.6, 146.9, 151.3, 159.1, 166.2, 185.7 (quart. C); C₁₉H₁₁ClN₄OS₂ (410.90); ber. C 55.54, H 2.70, N 13.64, S 15.61; gef. C 55.38, H 2.84, N 13.92, S 15.54; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, $t_N = 3.92$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{\max} : 332 nm, 294 nm.

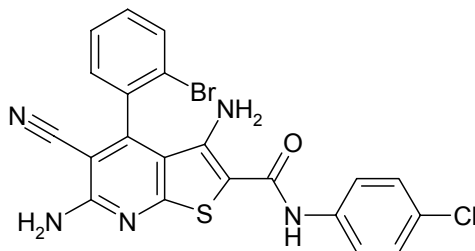
3,6-Diamino-*N*-(4-chlorphenyl)-5-cyan-4-(2-iodphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carboxamid
(43a)



Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-iodphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62c**) (113.5 mg, 0.300 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 μ l, 0.600 mmol) und 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (61.2 mg, 0.300 mmol). Reaktionsdauer: 40 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 78.4 mg (48%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 270-271 °C; IR (KBr): 3480 cm⁻¹, 3450 cm⁻¹, 3394 cm⁻¹ und 3320 cm⁻¹ (NH), 2212 cm⁻¹ (C≡N), 1630 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 5.66 (br s, 2 H, NH₂), 7.33-7.35 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.37 („dt“, 1 H, $J = 7.9/1.7$ Hz, ArH), 7.50-7.61 (s, 2 H, NH₂), überlagert mit 7.57 (dd, 1 H, $J = 7.5/1.5$ Hz, ArH), 7.65-7.68 (m, 3 H, ArH), 8.12 (dd, 1 H, $J = 7.9/0.9$ Hz, ArH), 9.45 (s, 1 H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 121.6 (2 C), 127.4 (2 C), 128.0, 128.3, 130.8, 138.4 (tert. C); 89.3, 91.6, 96.8, 112.6, 114.2, 126.0, 137.1, 137.5, 146.4, 153.0, 157.8, 162.7, 162.9 (quart. C); C₂₁H₁₃ClIN₅OS (545.78); ber. C 46.21, H 2.40, N 12.83, S 5.88; gef. C 46.19, H 2.55, N 12.85, S 5.65; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, $t_N = 4.69$ min, $t_M = 1.02$ min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{\max} : 320 nm, 223 nm, 283 nm.

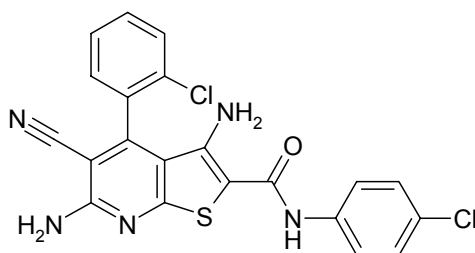
3,6-Diamino-4-(2-bromphenyl)-N-(4-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carboxamid
(43b)



Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-bromphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62d**) (132.5 mg, 0.400 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 224 µl, 0.800 mmol) und 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)acetamid (81.6 mg, 0.400 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 91.7 mg (46%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 297-298 °C; IR (KBr): 3482 cm⁻¹, 3459 cm⁻¹, 3400 cm⁻¹ und 3322 cm⁻¹ (NH), 3171 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2212 cm⁻¹ (C≡N), 1631 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 5.69 (br s, 2 H, NH₂), 7.33-7.35 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.52-7.60 (br s, 2 H, NH₂ überlagert mit m, 1 H, ArH), 7.62 (dd, 1 H, *J* = 7.5/1.9 Hz, ArH), 7.64-7.67 (m, 3 H, ArH), 7.92 (dd, 1 H, *J* = 8.1/1.1 Hz, ArH), 9.46 (s, 1 H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 121.2 (2 C), 126.9 (2 C), 127.4, 128.7, 130.8, 131.8 (tert. C); 88.9, 91.3, 112.3, 113.8, 119.9, 125.6, 133.0, 136.6, 146.0, 149.6, 157.3, 162.3, 162.5 (quart. C); C₂₁H₁₃BrClN₅OS (498.78); ber. C 50.57, H 2.63, N 14.04, S 6.43; gef. C 50.24, H 2.72, N 14.35, S 6.11; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, *t*_N = 3.79 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 318 nm, 282 nm, 385 nm.

3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)-N-(4-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carboxamid
(43c)

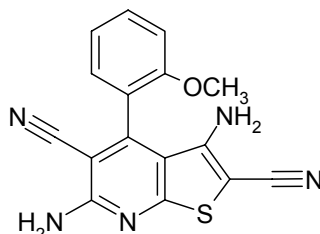


Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62e**) (114.8 mg, 0.400 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 224 µl, 0.800

mmol) und 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (82.1 mg, 0.402 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 54.0 mg (30%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 306-307 °C; IR (KBr): 3485 cm⁻¹, 3466 cm⁻¹, 3405 cm⁻¹ und 3322 cm⁻¹ (NH), 3167 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2220 cm⁻¹ (C≡N), 1631 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 5.70 (br s, 2 H, NH₂, Signal wird bei D₂O-Zugabe gelöscht), 7.33-7.35 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.58 (br s, 2 H, NH₂, Signal wird bei D₂O-Zugabe gelöscht), 7.60-7.68 (m, 5 H, ArH), 7.77 (dd, 1 H, *J* = 8.0/0.7 Hz, ArH), 9.47 (s, 1 H, NH, Signal wird bei D₂O-Zugabe gelöscht); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 122.4 (2 C), 128.1, 128.2 (2 C), 130.0, 130.0, 132.0 (tert. C); 90.2, 92.7, 113.6, 115.0, 126.8, 131.2, 132.1, 137.8, 147.3, 149.2, 158.6, 163.5, 163.8 (quart. C); C₂₁H₁₃Cl₂N₅OS (454.33); ber. C 55.52, H 2.88, N 15.41, S 7.06; gef. C 55.43, H 3.00, N 15.25, S 6.94; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, *t*_N = 4.31 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 318 nm, 282 nm, 384 nm.

3,6-Diamino-4-(2-methoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44a**)

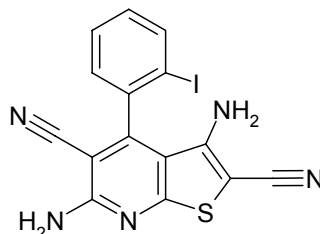


Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62b**) (113 mg, 0.401 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 224 µl, 0.800 mmol) und Chloracetonitril (25.2 µl, 0.400 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Man erhält 67.0 mg (52%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 303-304 °C; IR (KBr): 3460 cm⁻¹, 3420 cm⁻¹, 3330 cm⁻¹ und 3230 cm⁻¹ (NH), 2210 cm⁻¹ und 2194 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 5.33 (s, 2 H, NH₂), 7.19 („dt“, 1 H, *J* = 7.6/0.8 Hz, ArH), 7.31 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.39 (dd, 1 H, *J* = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.53 (br s, 2 H, NH₂), 7.60-7.65 (m, 1 H, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.4 (OCH₃); 111.6, 120.5, 128.9, 131.7 (tert. C); 67.8, 90.9, 111.7, 114.6, 115.0, 120.6, 149.3, 149.8, 155.2, 158.3, 163.9 (quart. C); C₁₆H₁₁N₅OS (321.36); ber. C 59.80, H 3.45, N 21.79, S 9.98; gef. C 59.54, H 3.50, N 21.84, S 9.80;

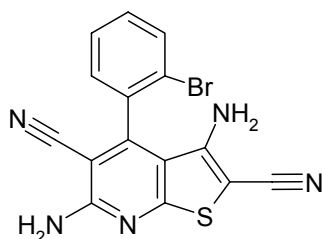
HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm, t_N = 5.60 min, t_M = 1.01 min (ACN/H₂O; 35:65), λ_{\max} : 302 nm.

3,6-Diamino-4-(2-iodophenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44b**)



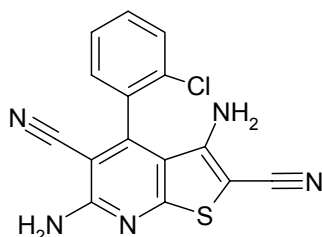
Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-iodophenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62c**) (114 mg, 0.302 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 168 μ l, 0.600 mmol) und Chloracetonitril (18.9 μ l, 0.300 mmol). Reaktionsdauer: 4 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 58.3 mg (47%) gelbe Kristalle.

Schmp.: ab 264 °C Dunkelfärbung, 272-273 °C dunkle Schmelze; IR (KBr): 3469 cm^{-1} , 3321 cm^{-1} , 3221 cm^{-1} und 3165 cm^{-1} (NH), 2200 cm^{-1} (Doppelpeak, C \equiv N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 5.19 (s, 2 H, NH₂), 7.39 („dt“, 1 H, J = 7.8/1.8 Hz, ArH), 7.57 (dd, 1 H, J = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.60-7.73 (br s, 2 H, NH₂, überlagert mit „dt“ bei 7.67 ppm, Signallöschung mit D₂O), 7.67 („dt“, 1 H, J = 7.6/1.0 Hz, ArH), 8.12 (dd, 1 H, J = 7.8/1.0 Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 128.5, 128.6, 131.3, 138.6 (tert. C); 68.1, 90.0, 97.1, 111.0, 114.1, 114.8, 137.2, 149.2, 153.3, 158.2, 164.0 (quart. C); C₁₅H₈IN₅S (417.23); ber. C 43.18, H 1.93, N 16.79, S 7.69; gef. C 43.39, H 2.11, N 16.81, S 7.56; HPLC: 98.5% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm, t_N = 4.84 min, t_M = 1.01 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{\max} : 304 nm, 281 nm, 376 nm.

3,6-Diamino-4-(2-bromphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44c**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-bromphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62d**) (91.2 mg, 0.275 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 154 μ l, 0.550 mmol) und Chloracetonitril (17.3 μ l, 0.275 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Man erhält 78.2 mg (77%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 262-263 °C; IR (KBr): 3472 cm^{-1} , 3319 cm^{-1} und 3219 cm^{-1} (NH), 2217 cm^{-1} und 2200 cm^{-1} (C \equiv N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 5.21 (s, 2 H, NH $_2$), 7.57-7.69 (m, 5 H, ArH und NH $_2$ überlagert), 7.93 (dd, 1 H, J = 7.8/0.8 Hz, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 128.9, 130.3, 132.6, 133.4 (tert. C); 69.1, 90.9, 111.8, 114.9, 115.5, 121.5, 133.9, 150.1, 151.1, 158.9, 164.9 (quart. C); C $_{15}$ H $_8$ BrN $_5$ S (370.23); ber. C 48.66, H 2.18, N 18.92, S 8.66; gef. C 48.60, H 2.20, N 19.14, S 8.50; HPLC: 98.6% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm, t_N = 4.33 min, t_M = 1.01 min (ACN/H $_2$ O; 40:60), λ_{max} : 303 nm, 280 nm, 375 nm.

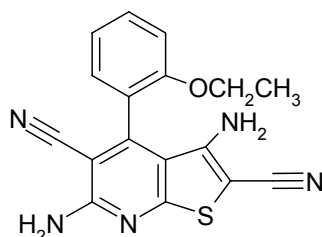
3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44d**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62e**) (165 mg, 0.574 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 321 μ l, 1.15 mmol) und Chloracetonitril (36.1 μ l, 0.574 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 35.2 mg (19%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 259-262 °C; IR (KBr): 3468 cm^{-1} , 3324 cm^{-1} und 3221 cm^{-1} (NH), 2218 cm^{-1} und 2196 cm^{-1} (C \equiv N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 5.23 (s, 2 H, NH $_2$), 7.60-7.71

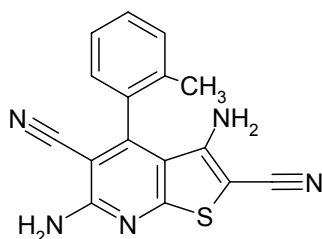
(m, 5 H, ArH und NH₂ überlagert), 7.78 (d, 1 H, $J = 8.1$ Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 128.2, 130.1, 130.2, 132.4 (tert. C); 69.1, 90.8, 111.7, 114.7, 115.3, 131.4, 131.6, 149.3, 149.9, 158.7, 164.7 (quart. C); C₁₅H₈ClN₅S (325.78); ber. C 55.30, H 2.48, N 21.50, S 9.84; gef. C 55.47, H 2.77, N 21.31, S 9.54; HPLC: 96.1% bei 254 nm und 97.4% bei 280 nm, $t_N = 4.63$ min, $t_M = 1.02$ min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max} : 303 nm, 280 nm, 375 nm.

3,6-Diamino-4-(2-ethoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44e**)



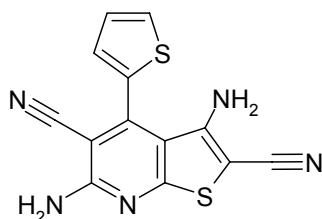
Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-ethoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62g**) (127 mg, 0.430 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 241 μ l, 0.860 mmol) und Chloracetonitril (27.1 μ l, 0.430 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 67.3 mg (47%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 270-271 °C; IR (KBr): 3473 cm⁻¹, 3417 cm⁻¹, 3338 cm⁻¹ und 3221 cm⁻¹ (NH), 2217 cm⁻¹ und 2192 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.16 (t, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH₃), 4.10 (q, 2 H, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 5.34 (br s, 2 H, NH₂), 7.17 („dt“, 1 H, $J = 7.6/1.0$ Hz, ArH), 7.29 (d, 1 H, $J = 8.3$ Hz, ArH), 7.37 (dd, 1 H, $J = 7.6/1.8$ Hz, ArH), 7.51 (br s, 2 H, NH₂), 7.60 (ddd, 1 H, $J = 7.6/1.8/1.0$ Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 14.2 (CH₃); 63.9 (CH₂); 113.2, 120.9, 129.5, 132.1 (tert. C); 68.2, 91.3, 112.1, 115.2, 115.5, 121.2, 149.8, 150.4, 154.9, 158.8, 164.3 (quart. C); C₁₇H₁₃N₅OS (335.38); ber. C 60.88, H 3.91, N 20.88, S 9.56; gef. C 60.98, H 3.93, N 21.08, S 9.29; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm, $t_N = 5.77$ min, $t_M = 1.02$ min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max} : 302 nm.

3,6-Diamino-4-(2-methylphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44f**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-methylphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62h**) (134 mg, 0.502 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 281 μ l, 1.00 mmol) und Chloracetonitril (31.6 μ l, 0.502 mmol). Reaktionsdauer: 40 min. Man erhält 119 mg (78%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 253-255 °C; IR (KBr): 3463 cm^{-1} , 3329 cm^{-1} und 3225 cm^{-1} (NH), 2217 cm^{-1} und 2194 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 2.08 (s, 3 H, CH₃), 5.21 (s, 2 H, NH₂), 7.37 (dd, 1 H, J = 7.6/1.5 Hz, ArH), 7.43-7.47 (m, 1 H, ArH), 7.48-7.56 (m, 2 H, ArH), 7.60 (br s, 2 H, NH₂); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 18.8 (CH₃); 126.7, 128.0, 130.3, 130.6 (tert. C); 68.3, 90.5, 111.6, 114.9, 115.4, 132.3, 135.0, 150.1, 151.9, 158.8, 164.6 (quart. C); C₁₆H₁₁N₅S (305.36); ber. C 62.93, H 3.63, N 22.93, S 10.50; gef. C 62.74, H 3.64, N 22.76, S 10.35; HPLC: 97.5% bei 254 nm und 98.7% bei 280 nm, t_N = 4.61 min, t_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max} : 302 nm, 369 nm.

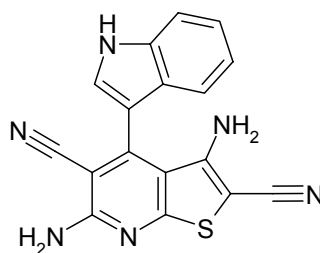
3,6-Diamino-4-(2-thienyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44g**)

Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(2-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62j**) (97.8 mg, 0.379 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 212 μ l, 0.758 mmol) und Chloracetonitril (23.8 μ l, 0.379 mmol). Reaktionsdauer: 45 min. Man erhält 103 mg (91%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 309-310 °C; IR (KBr): 3479 cm^{-1} , 3379 cm^{-1} und 3315 cm^{-1} (NH), 2213 cm^{-1} und 2191 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 5.52 (br s, 2 H, NH₂), 7.33 (dd, 1 H, J = 5.1/3.5 Hz, Thiophen-H), 7.44 (dd, 1 H, J = 3.5/1.3, Thiophen-H), 7.60 (br s, 2 H,

NH₂), 7.99 (dd, 1 H, $J = 5.1/1.3$ Hz, Thiophen-H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 128.0, 130.0, 130.4 (tert. C); 68.6, 92.3, 112.5, 114.9, 115.4, 131.5, 145.5, 150.1, 158.5, 164.5 (quart. C); C₁₃H₇N₅S₂ (297.36); ber. C 52.51, H 2.37, N 23.55, S 21.57; gef. C 52.82, H 2.53, N 23.61, S 21.47; HPLC: 97.2% bei 254 nm und 97.3% bei 280 nm, $t_N = 3.32$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{\max} : 306 nm, 280 nm, 384 nm.

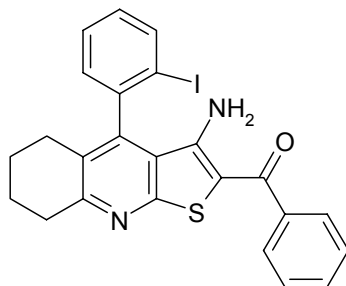
3,6-Diamino-4-(1*H*-indol-3-yl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44h**)



Nach AAV 6 aus 6-Amino-4-(1*H*-indol-3-yl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62i**) (62.0 mg, 0.213 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 119 μ l, 0.426 mmol) und Chloracetonitril (13.4 μ l, 0.213 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/H₂O; 40:60) erhält man 10.5 mg (15%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: Zersetzung ab 293 °C, 316 °C schwarze Schmelze; IR (KBr): 3450 cm⁻¹, 3394 cm⁻¹, 3323 cm⁻¹ und 3222 cm⁻¹ (NH), 2217 cm⁻¹ und 2191 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 5.60 (br s, 2 H, NH₂), 7.10-7.14 (m, 1 H, ArH), 7.23-7.27 (m, 1 H, ArH), 7.30 (d, 1 H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.46 (br s, 2 H, NH₂), 7.56 (d, 1 H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.81 (d, 1 H, $J = 2.5$ Hz, ArH), 11.92 (d, 1 H, $J = 2.3$ Hz, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 112.3, 118.9, 120.5, 122.5, 126.6 (tert. C); 67.3, 92.2, 106.4, 112.9, 115.8, 116.0, 125.2, 135.8, 146.8, 150.8, 159.2, 164.7 (quart. C); C₁₇H₁₀N₆S (330.37); MS (EI): m/z (%) = 330 [M]⁺ (100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 330.0688; gef. 330.0684; HPLC: 97.6% bei 254 nm und 98.1% bei 280 nm, $t_N = 3.21$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{\max} : 305 nm, 277 nm.

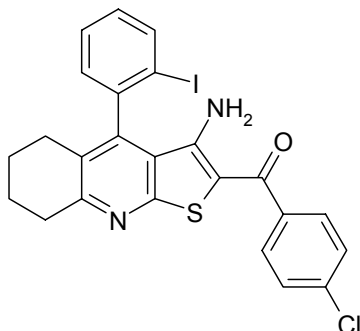
[3-Amino-4-(2-iodophenyl)-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]chinolin-2-yl](phenyl)methanon
(45a)



Nach AAV 6 aus 4-(2-Iodphenyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72c**) (67.7 mg, 0.173 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 96.9 µl, 0.346 mmol) und 2-Brom-1-phenylethanon (34.4 mg, 0.173 mmol). Reaktionsdauer: 50 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 39.4 mg (45%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 216-218 °C; IR (KBr): 3482 cm⁻¹ und 3314 cm⁻¹ (NH), 2941 cm⁻¹ und 2921 cm⁻¹ (CH aliphatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.66-1.77 (m, 2 H, CH₂), 1.79-1.87 (m, 2 H, CH₂), 2.21-2.32 (m, 2 H, CH₂), 2.97-3.06 (m, 2 H, CH₂), 6.53 (br s, 2 H, NH₂), 7.36 („dt“, 1 H, *J* = 7.9/1.5 Hz, ArH), 7.45 (dd, 1 H, *J* = 7.5/1.5 Hz, ArH), 7.52-7.55 (m, 2 H, ArH), 7.57-7.60 (m, 1 H, ArH), 7.67 („dt“, 1 H, *J* = 7.5/1.1 Hz, ArH), 7.74-7.76 (m, 2 H, ArH), 8.15 (dd, 1 H, *J* = 7.9/0.9 Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.9 (2 C), 25.8, 33.1 (sek. C); 127.1 (2 C), 128.4 (2 C), 128.8, 129.4, 131.0, 131.0, 139.3 (tert. C); 98.4, 102.6, 119.2, 126.5, 139.3, 140.7, 148.2, 150.0, 158.7, 161.0, 188.9 (quart C); C₂₄H₁₉IN₂OS (510.39); ber. C 56.48, H 3.75, N 5.49, S 6.28; gef. C 56.46, H 3.79, N 5.70, S 6.19; HPLC: 98.7% bei 254 nm und 98.3% bei 280 nm, *t*_N = 5.38 min, *t*_M = 1.06 min (ACN/H₂O; 75:25), λ_{max}: 307 nm, 318 nm.

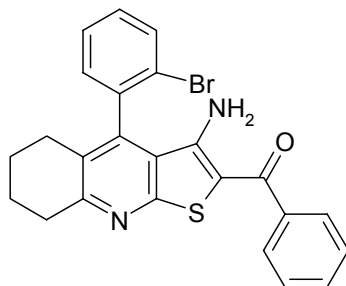
[3-Amino-4-(2-iodophenyl)-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]chinolin-2-yl](4-chlorphenyl)-methanon (**45b**)



Nach AAV 6 aus 4-(2-Iodphenyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72c**) (51.2 mg, 0.131 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 73.4 µl, 0.262 mmol) und 2-Brom-1-(4-chlorphenyl)ethanon (30.9 mg, 0.132 mmol). Reaktionsdauer: 40 min. Man erhält 35.1 mg (49%) eines braungelben Pulvers.

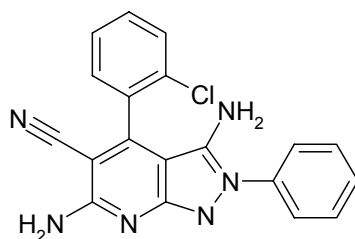
Schmp.: 211-212 °C; IR (KBr): 3469 cm⁻¹ (NH), 2928 cm⁻¹ (CH aliphatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.66-1.77 (m, 2 H, CH₂), 1.79-1.88 (m, 2 H, CH₂), 2.20-2.32 (m, 2 H, CH₂), 2.97-3.06 (m, 2 H, CH₂), 6.56 (br s, 2 H, NH₂), 7.36 („dt“, 1 H, *J* = 7.9/1.5 Hz, ArH), 7.45 (dd, 1 H, *J* = 7.5/1.1 Hz, ArH), 7.60-7.62 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.67 („dt“, 1 H, *J* = 7.5/0.6 Hz, ArH), 7.77-7.79 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 8.15 (d, 1 H, *J* = 7.9 Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.9 (2 C), 25.8, 33.1 (sek. C); 128.5 (2 C), 128.7, 129.1 (2 C), 129.4, 131.0, 139.3 (tert. C); 98.4, 102.3, 119.1, 126.6, 135.7, 139.2, 139.3, 148.2, 150.3, 158.7, 161.2, 187.4 (quart. C); C₂₄H₁₈ClIN₂OS (544.84); ber. C 52.91, H 3.33, N 5.14, S 5.89; gef. C 52.84, H 3.41, N 5.33, S 5.82; HPLC: 97.1% bei 254 nm und 97.3% bei 280 nm, *t*_N = 5.84 min, *t*_M = 1.08 min (ACN/H₂O; 80:20), λ_{max}: 283 nm, 321 nm.

[3-Amino-4-(2-bromophenyl)-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]chinolin-2-yl](phenyl)methanon
(45c)



Nach AAV 6 aus 4-(2-Bromphenyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72d**) (36.2 mg, 0.105 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (zweimal 58.8 µl, 0.210 mmol) und 2-Brom-1-phenylethanon (20.9 mg, 0.105 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 18.0 mg (37%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 219-221 °C; IR (KBr): 3482 cm⁻¹ und 3313 cm⁻¹ (NH), 2941 cm⁻¹, 2923 cm⁻¹ und 2854 cm⁻¹ (CH aliphatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.64-1.76 (m, 2 H, CH₂), 1.81-1.85 (m, 2 H, CH₂), 2.23-2.36 (m, 2 H, CH₂), 2.98-3.06 (m, 2 H, CH₂), 6.55 (br s, 2 H, NH₂), 7.50 (dd, 1 H, *J* = 7.5/1.5 Hz, ArH), 7.53-7.60 (m, 4 H, ArH), 7.66 („dt“, 1 H, *J* = 7.5/0.8 Hz, ArH), 7.74-7.75 (m, 2 H, ArH), 7.94 (d, 1 H, *J* = 7.5 Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.9 (2 C), 24.7, 32.1 (sek. C); 126.2 (2 C), 127.5 (2 C), 128.0, 128.9, 130.1, 130.5, 132.3 (tert. C); 101.8, 118.4, 120.6, 125.9, 134.2, 139.7, 144.2, 149.0, 157.8, 160.0, 188.0 (quart. C); C₂₄H₁₉BrN₂OS (463.39); ber. C 62.21, H 4.13, N 6.05, S 6.92; gef. C 61.98, H 4.22, N 6.20, S 7.11; HPLC: 99.0% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, *t*_N = 5.35 min, *t*_M = 1.06 min (ACN/H₂O; 75:25), λ_{max}: 282 nm, 307 nm, 318 nm.

3,6-Diamino-4-(2-chlorophenyl)-2-phenyl-2H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-carbonitril (**46a**)

Nach AAV 8 aus 3-(2-Chlorphenyl)cyclopropan-1,1,2,2-tetracarbonitril (**93a**) (200 mg, 0.790 mmol) und Phenylhydrazin (118 μ l, 1.18 mmol). Nach Umkristallisation aus Methanol erhält man 56.7 mg (20%) gelbe Nadeln.

Schmp.: 156-157 °C; IR (KBr): 3477 cm^{-1} und 3362 cm^{-1} (NH), 2216 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 5.18 (s, 2 H, NH₂, Signallöschung bei D₂O-Zugabe), 6.71 (s, 2 H, NH₂, Signallöschung bei D₂O-Zugabe), 7.42-7.45 (m, 1 H, ArH), 7.53-7.58 (m, 4 H, ArH), 7.58-7.60 (m, 2 H, ArH), 7.61-7.65 (m, 1 H, ArH), 7.75-7.76 (m, 1 H, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 124.4 (2 C), 127.9, 128.0, 129.4 (2 C), 130.0, 130.1, 131.6 (tert. C); 87.1, 95.4, 116.6, 131.1, 132.1, 137.6, 141.7, 150.7, 156.1, 157.9 (quart. C); C₁₉H₁₃ClN₆ (360.80); ber. C 63.25, H 3.63, N 23.29; gef. C 62.50, H 3.63, N 22.91; MS (EI): m/z (%) = 360 [M]⁺ (100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 360.0890; gef. 360.0887; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm, t_N = 2.09 min, t_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max} : 241 nm, 344 nm.

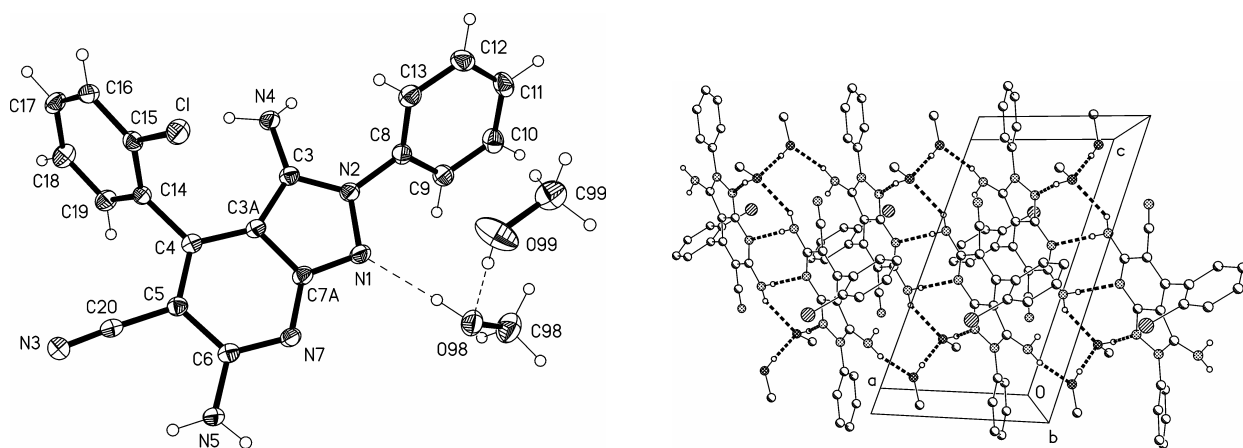


Abbildung 9-1: Röntgenkristallstrukturen von **46a** mit Methanol^a

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

Tabelle 9-1: Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClN}_6\text{O}_2$	
M_r	424.89	
Temperatur	100(2) K	
Wellenlänge	1.54184 Å	
Kristallsystem	Triklin	
Raumgruppe	P(-1)	
Gitterkonstanten	$a = 7.2931(8)$ Å	$\alpha = 104.764(12)^\circ$
	$b = 11.946(2)$ Å	$\beta = 103.136(11)^\circ$
	$c = 13.545(2)$ Å	$\gamma = 106.392(12)^\circ$
Volumen	1036.2(3) Å ³	
Z	2	
Dichte (berechnet)	1.362 Mg/m ³	
Absorptionskoeffizient	1.889 mm ⁻¹	
F(000)	444	
Kristallgröße	0.15 x 0.10 x 0.05 mm ³	
θ -Bereich für die Datensammlung	3.57 bis 70.93°	
Limitierende Indices	-8 ≤ h ≤ 8, -14 ≤ k ≤ 13, -16 ≤ l ≤ 15	
Zahl der Reflexe	9516	
Unabhängige Reflexe	3711 [R(int) = 0.0154]	
Vollständigkeit bis $\theta = 67.50^\circ$	95.4 %	
Absorptionskorrektur	Semi-empirical from equivalents	
Max. und Min. Transmission	1.00000 und 0.75164	
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F ²	
Daten/Einschränkungen/Parameter	3711 / 0 / 297	
Goodness-of-fit on F ²	1.080	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0331, wR2 = 0.0871	
R indices (all data)	R1 = 0.0360, wR2 = 0.0894	
Größte Differenzpeaks	0.503 und -0.355 e.Å ⁻³	

Tabelle 9-2: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} Tensors.^{a,b}

	x	y	z	U(eq)
N(1)	5321.1(19)	3936.3(11)	2557.8(10)	22.3(3)
N(2)	3707.1(18)	4131.0(11)	1924.7(10)	20.2(3)
N(3)	8191(2)	8706.1(12)	7054.6(10)	26.8(3)
N(4)	1822.8(19)	5464.3(12)	1997.1(10)	21.7(3)
N(5)	9453.4(19)	6141.5(12)	6103.4(10)	20.1(3)
N(7)	7543.3(18)	5037.8(10)	4339.7(10)	19.3(3)
C(3)	3346(2)	5125.5(13)	2446.6(11)	18.2(3)
C(3A)	4826(2)	5661.1(12)	3476.5(11)	17.5(3)
C(4)	5317(2)	6690.0(12)	4395.6(11)	16.8(3)
C(5)	6874(2)	6840.9(12)	5281.6(11)	17.4(3)
C(6)	7960(2)	5983.2(12)	5224.8(11)	17.7(3)
C(7A)	5970(2)	4871.5(12)	3484.6(11)	18.2(3)
C(8)	2767(2)	3344.4(13)	818.5(11)	20.5(3)
C(9)	2064(2)	2065.9(14)	573.6(12)	23.1(3)
C(10)	1234(2)	1304.7(14)	-503.7(12)	26.4(3)
C(11)	1102(2)	1817.0(15)	-1314.7(12)	26.9(3)
C(12)	1799(2)	3096.1(16)	-1057.0(13)	27.0(3)
C(13)	2643(2)	3870.8(14)	16.4(12)	24.0(3)
C(14)	4216(2)	7568.4(12)	4405.0(11)	17.4(3)
C(15)	4382(2)	8323.6(13)	3768.4(11)	18.4(3)
C(16)	3265(2)	9087.1(13)	3723.5(11)	20.9(3)
C(17)	1979(2)	9113.3(13)	4330.9(12)	23.1(3)
C(18)	1830(2)	8399.3(14)	4993.3(13)	24.9(3)
C(19)	2941(2)	7628.5(13)	5027.5(12)	22.0(3)
C(20)	7550(2)	7878.1(13)	6258.2(11)	19.5(3)
Cl	6071.3(6)	8351.9(3)	3042.8(3)	24.6(1)
C(98)	5899(3)	879.7(16)	1727.1(16)	38.7(4)
O(98)	7049.9(18)	2169.3(11)	2074.2(9)	31.1(3)

C(99)	7056(3)	2663.7(16)	-317.1(15)	34.6(4)
O(99)	8115(2)	3525.7(14)	728.8(11)	47.8(4)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 9-3: Bindungslängen [Å]^{a,b}

N(1)-C(7A)	1.3284(19)	C(8)-C(13)	1.385(2)
N(1)-N(2)	1.4045(16)	C(8)-C(9)	1.389(2)
N(2)-C(3)	1.3468(18)	C(9)-C(10)	1.391(2)
N(2)-C(8)	1.4317(18)	C(10)-C(11)	1.385(2)
N(3)-C(20)	1.152(2)	C(11)-C(12)	1.387(2)
N(4)-C(3)	1.3566(19)	C(12)-C(13)	1.391(2)
N(5)-C(6)	1.3483(19)	C(14)-C(19)	1.394(2)
N(7)-C(6)	1.3250(19)	C(14)-C(15)	1.398(2)
N(7)-C(7A)	1.3591(18)	C(15)-C(16)	1.387(2)
C(3)-C(3A)	1.411(2)	C(15)-Cl	1.7406(15)
C(3A)-C(4)	1.399(2)	C(16)-C(17)	1.383(2)
C(3A)-C(7A)	1.4255(19)	C(17)-C(18)	1.388(2)
C(4)-C(5)	1.385(2)	C(18)-C(19)	1.390(2)
C(4)-C(14)	1.4899(19)	C(98)-O(98)	1.421(2)
C(5)-C(20)	1.432(2)	C(99)-O(99)	1.405(2)
C(5)-C(6)	1.4590(19)		

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 9-4: Bindungswinkel [$^{\circ}$]^{a,b}

C(7A)-N(1)-N(2)	103.51(11)	N(1)-C(7A)-C(3A)	112.44(12)
C(3)-N(2)-N(1)	113.28(11)	N(7)-C(7A)-C(3A)	124.48(13)
C(3)-N(2)-C(8)	128.17(12)	C(13)-C(8)-C(9)	121.48(13)
N(1)-N(2)-C(8)	118.36(11)	C(13)-C(8)-N(2)	119.49(13)
C(6)-N(7)-C(7A)	116.11(12)	C(9)-C(8)-N(2)	118.98(13)
N(2)-C(3)-N(4)	123.14(13)	C(8)-C(9)-C(10)	118.80(14)
N(2)-C(3)-C(3A)	105.89(12)	C(11)-C(10)-C(9)	120.40(15)
N(4)-C(3)-C(3A)	130.96(13)	C(10)-C(11)-C(12)	120.13(14)
C(4)-C(3A)-C(3)	135.66(13)	C(11)-C(12)-C(13)	120.21(15)
C(4)-C(3A)-C(7A)	119.49(12)	C(8)-C(13)-C(12)	118.98(14)
C(3)-C(3A)-C(7A)	104.84(12)	C(19)-C(14)-C(15)	118.29(13)
C(5)-C(4)-C(3A)	116.30(12)	C(19)-C(14)-C(4)	120.54(13)
C(5)-C(4)-C(14)	122.51(12)	C(15)-C(14)-C(4)	121.15(13)
C(3A)-C(4)-C(14)	121.19(12)	C(16)-C(15)-C(14)	121.39(14)
C(4)-C(5)-C(20)	121.39(12)	C(16)-C(15)-Cl	118.66(11)
C(4)-C(5)-C(6)	120.69(12)	C(14)-C(15)-Cl	119.92(11)
C(20)-C(5)-C(6)	117.82(12)	C(17)-C(16)-C(15)	119.33(13)
N(7)-C(6)-N(5)	117.65(13)	C(16)-C(17)-C(18)	120.42(13)
N(7)-C(6)-C(5)	122.84(12)	C(17)-C(18)-C(19)	119.93(15)
N(5)-C(6)-C(5)	119.51(13)	C(18)-C(19)-C(14)	120.60(14)
N(1)-C(7A)-N(7)	123.08(12)	N(3)-C(20)-C(5)	176.41(15)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 9-5: Torsionswinkel [$^{\circ}$]^{a,b}

C(7A)-N(1)-N(2)-C(3)	-1.42(17)	N(1)-N(2)-C(3)-C(3A)	1.88(17)
C(7A)-N(1)-N(2)-C(8)	174.02(13)	C(8)-N(2)-C(3)-C(3A)	-173.01(14)
N(1)-N(2)-C(3)-N(4)	-178.16(14)	N(2)-C(3)-C(3A)-C(4)	179.56(16)
C(8)-N(2)-C(3)-N(4)	7.0(2)	N(4)-C(3)-C(3A)-C(4)	-0.4(3)

N(2)-C(3)-C(3A)-C(7A)	-1.52(16)	C(3)-N(2)-C(8)-C(9)	-131.81(16)
N(4)-C(3)-C(3A)-C(7A)	178.53(16)	N(1)-N(2)-C(8)-C(9)	53.52(19)
C(3)-C(3A)-C(4)-C(5)	176.42(16)	C(13)-C(8)-C(9)-C(10)	0.5(2)
C(7A)-C(3A)-C(4)-C(5)	-2.4(2)	N(2)-C(8)-C(9)-C(10)	-177.13(14)
C(3)-C(3A)-C(4)-C(14)	-3.8(3)	C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	-0.5(2)
C(7A)-C(3A)-C(4)-C(14)	177.38(13)	C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	0.1(2)
C(3A)-C(4)-C(5)-C(20)	178.25(13)	C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	0.3(2)
C(14)-C(4)-C(5)-C(20)	-1.5(2)	C(9)-C(8)-C(13)-C(12)	-0.2(2)
C(3A)-C(4)-C(5)-C(6)	2.0(2)	N(2)-C(8)-C(13)-C(12)	177.46(13)
C(14)-C(4)-C(5)-C(6)	-177.79(13)	C(11)-C(12)-C(13)-C(8)	-0.2(2)
C(7A)-N(7)-C(6)-N(5)	177.09(13)	C(5)-C(4)-C(14)-C(19)	-69.30(19)
C(7A)-N(7)-C(6)-C(5)	-2.7(2)	C(3A)-C(4)-C(14)-C(19)	110.95(16)
C(4)-C(5)-C(6)-N(7)	0.6(2)	C(5)-C(4)-C(14)-C(15)	112.69(16)
C(20)-C(5)-C(6)-N(7)	-175.77(13)	C(3A)-C(4)-C(14)-C(15)	-67.06(19)
C(4)-C(5)-C(6)-N(5)	-179.16(14)	C(19)-C(14)-C(15)-C(16)	-2.1(2)
C(20)-C(5)-C(6)-N(5)	4.4(2)	C(4)-C(14)-C(15)-C(16)	176.00(13)
N(2)-N(1)-C(7A)-N(7)	179.92(14)	C(19)-C(14)-C(15)-Cl	176.03(11)
N(2)-N(1)-C(7A)-C(3A)	0.36(16)	C(4)-C(14)-C(15)-Cl	-5.92(18)
C(6)-N(7)-C(7A)-N(1)	-177.23(14)	C(14)-C(15)-C(16)-C(17)	0.8(2)
C(6)-N(7)-C(7A)-C(3A)	2.3(2)	Cl-C(15)-C(16)-C(17)	-177.32(11)
C(4)-C(3A)-C(7A)-N(1)	179.85(13)	C(15)-C(16)-C(17)-C(18)	1.1(2)
C(3)-C(3A)-C(7A)-N(1)	0.72(17)	C(16)-C(17)-C(18)-C(19)	-1.6(2)
C(4)-C(3A)-C(7A)-N(7)	0.3(2)	C(17)-C(18)-C(19)-C(14)	0.3(2)
C(3)-C(3A)-C(7A)-N(7)	-178.83(14)	C(15)-C(14)-C(19)-C(18)	1.5(2)
C(3)-N(2)-C(8)-C(13)	50.5(2)	C(4)-C(14)-C(19)-C(18)	-176.58(13)
N(1)-N(2)-C(8)-C(13)	-124.19(15)		

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 9-6: Wasserstoffbrückenbindungen [\AA und $^\circ$]^{a,b}

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(4)-H(01)...O(99)#1	0.86(2)	1.97(2)	2.8200(19)	166.7(18)
N(5)-H(03)...O(98)#2	0.896(19)	2.191(19)	2.8920(18)	134.7(15)
N(5)-H(04)...N(7)#2	0.88(2)	2.14(2)	3.0084(18)	171.6(18)
O(98)-H(05)...N(1)	0.90(3)	1.89(3)	2.7653(17)	161(2)
O(99)-H(06)...O(98)	0.84(3)	1.98(3)	2.826(2)	176(3)
C(9)-H(9)...N(3)#3	0.95	2.68	3.590(2)	160.3
C(16)-H(16)...N(3)#4	0.95	2.69	3.417(2)	133.8
C(99)-H(99A)...N(4)#5	0.98	2.67	3.641(2)	168.8
C(19)-H(19)...N(7)#3	0.95	2.62	3.4495(19)	146.6

Benutzte Symmetrietransformationen für die Generierung äquivalenter Atome:

#1 $x-1, y, z$

#2 $-x+2, -y+1, -z+1$

#3 $-x+1, -y+1, -z+1$

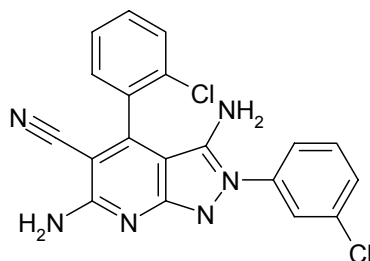
#4 $-x+1, -y+2, -z+1$

#5 $-x+1, -y+1, -z$

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)-2-(3-chlorphenyl)-2H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carbonitril (46b)

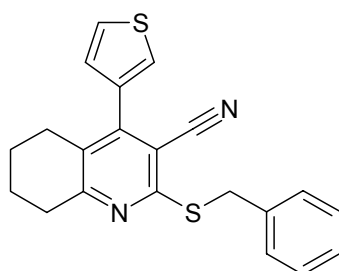


Nach AAV 8 aus 3-(2-Chlorphenyl)cyclopropan-1,1,2,2-tetracarbonitril (**93a**) (339 mg, 1.34 mmol) und 3-Chlorphenylhydrazin (287 mg, 2.01 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 98.4 mg (19%) gelbe Nadeln. Das 3-Chlorphenylhydrazin wird zunächst wie folgt aus dem Hydrochlorid gewonnen: 380 mg 3-Chlorphenylhydrazin-

Hydrochlorid werden in 10 ml 10%iger Natriumhydroxidlösung gelöst und dreimal mit 30 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Aus den vereinigten organischen Phasen wird im Vakuum das Lösungsmittel abgedampft, so dass das freie 3-Chlorphenylhydrazin zurückbleibt.

Schmp.: 161-162 °C; IR (KBr): 3426 cm^{-1} und 3319 cm^{-1} (NH), 2210 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 5.34 (s, 2 H, NH_2), 6.75 (s, 2 H, NH_2), 7.48-7.52 (m, 1 H, ArH), 7.55-7.57 (m, 2 H, ArH), 7.58-7.59 (m, 2 H, ArH), 7.61-7.64 (m, 1 H, ArH), 7.64-7.66 (m, 1 H, ArH), 7.74-7.76 (m, 1 H, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 123.1, 124.3, 127.7, 128.0, 129.9, 130.2, 131.0, 131.7 (tert. C); 87.4, 95.5, 116.5, 131.1, 132.0, 133.5, 139.0, 142.2, 150.8, 156.3, 158.0 (quart. C); $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_6$ (395.24); ber. C 57.74, H 3.06, N 21.26; gef. C 57.34, H 2.97, N 20.91; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, t_N = 3.75 min, t_M = 1.03 min (ACN/ H_2O ; 40:60), λ_{max} : 243 nm, 344 nm.

2-(Benzylsulfanyl)-4-(3-thienyl)-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-3-carbonitril (**51a**)

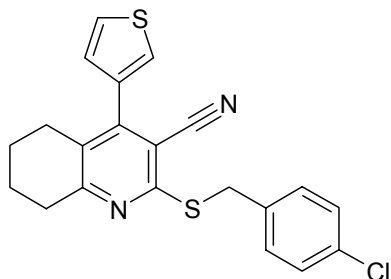


Nach AAV 7 aus 4-(3-Thienyl)-2-thio-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72k**) (81.5 mg, 0.299 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (168 μl , 0.300 mmol) und Benzylbromid (35.7 μl , 0.300 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 52.2 mg (48%) grüngaue Kristalle.

Schmp.: 132-133 °C; IR (KBr): 3091 cm^{-1} (CH aromatisch), 2939 cm^{-1} und 2868 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2218 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 1.63-1.69 (m, 2 H, CH_2), 1.79-1.85 (m, 2 H, CH_2), 2.45 (t, 2 H, J = 6.3 Hz, CH_2), 2.98 (t, 2 H, J = 6.3 Hz, CH_2), 4.51 (s, 2 H, CH_2), 7.22 (dd, 1 H, J = 4.8/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.23-7.26 (m, 1 H, ArH), 7.29-7.33 (m, 2 H, ArH), 7.43-7.47 (m, 2 H, ArH), 7.74 (dd, 1 H, J = 4.8/2.8 Hz, Thiophen-H), 7.77 (dd, 1 H, J = 2.8/1.3 Hz, Thiophen-H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 21.6, 21.8, 26.1, 32.8, 33.2 (sek. C); 126.4, 127.0 (2 C), 127.8, 128.3 (2 C), 129.1 (2 C) (tert. C); 103.9, 115.2, 127.1, 134.4, 137.8, 149.2, 157.2, 161.1 (quart. C);

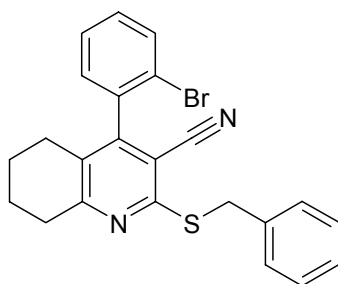
$C_{21}H_{18}N_2S_2$ (362.51); ber. C 69.58, H 5.00, N 7.73, S 17.69; gef. C 69.74, H 4.98, N 7.80, S 17.59; HPLC: 98.6% bei 254 nm und 97.9% bei 280 nm, $t_N = 3.83$ min, $t_M = 1.08$ min (ACN/H₂O; 80:20), λ_{max} : 268 nm, 326 nm.

2-[(4-Chlorbenzyl)sulfanyl]-4-(3-thienyl)-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-3-carbonitril (**51b**)



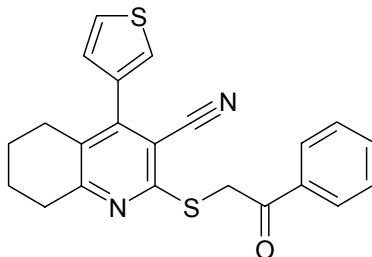
Nach AAV 7 aus 4-(3-Thienyl)-2-thio-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72k**) (77.1 mg, 0.283 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (159 μ l, 0.283 mmol) und 4-Chlorbenzylbromid (58.2 μ l, 0.283 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 18.0 mg (16%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 108-109 °C; IR (KBr): 3091 cm^{-1} (CH aromatisch), 2939 cm^{-1} und 2868 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2218 cm^{-1} (C \equiv N); 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.64-1.68 (m, 2 H, CH₂), 1.80-1.84 (m, 2 H, CH₂), 2.45 (t, 2 H, $J = 6.4$ Hz, CH₂), 2.97 (t, 2 H, $J = 6.4$ Hz, CH₂), 4.49 (s, 2 H, CH₂), 7.22-7.23 (m, 1 H, ArH), 7.36-7.39 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.48-7.50 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-System, ArH), 7.74-7.75 (m, 1 H, ArH), 7.77-7.79 (m, 1 H, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.6, 21.8, 26.1, 32.3, 32.8 (sek. C); 126.6, 127.1, 127.8, 128.2 (2 C), 131.0 (2 C) (tert. C); 103.9, 115.3, 127.1, 131.6, 134.3, 137.2, 149.2, 156.9, 161.2 (quart. C); $C_{21}H_{17}ClN_2S_2$ (396.96); ber. C 63.54, H 4.32, N 7.06, S 16.16; gef. C 63.28, H 4.40, N 7.43, S 16.00; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm, $t_N = 5.17$ min, $t_M = 1.06$ min (ACN/H₂O; 80:20), λ_{max} : 267 nm, 325 nm.

2-(Benzylsulfanyl)-4-(2-bromphenyl)-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-3-carbonitril (**51c**)

Nach AAV 7 aus 4-(2-Bromphenyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72d**) (39.2 mg, 0.114 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (63.8 µl, 0.114 mmol) und Benzylbromid (13.5 µl, 0.114 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 15.4 mg (31%) graugrüne Kristalle.

Schmp.: 142-143 °C; IR (KBr): 2931 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2216 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.63-1.73 (m, 2 H, CH₂), 1.80-1.84 (m, 2 H, CH₂), 2.15-2.28 (m, 2 H, CH₂), 2.96-3.06 (m, 2 H, CH₂), 4.50 (d, 1 H, *J* = 13.4 Hz, CH), 4.56 (d, 1 H, *J* = 13.6 Hz, CH), 7.25-7.27 (m, 1 H, ArH), 7.32-7.35 (m, 2 H, ArH), 7.38 (dd, 1 H, *J* = 7.5/1.7 Hz, ArH), 7.46 („dt“, 1 H, *J* = 7.9/1.7 Hz, ArH), 7.47-7.49 (m, 2 H, ArH), 7.56 („dt“, 1 H, *J* = 7.5/1.1 Hz, ArH), 7.82 (dd, 1 H, *J* = 8.1/1.1 Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.9, 21.0, 24.9, 32.1, 32.5 (CH₂); 126.5, 127.7 (2 C), 127.7, 128.5 (2 C), 129.1, 130.5, 132.1 (tert. C); 103.0, 113.8, 120.2, 126.1, 135.1, 136.9, 151.9, 156.5, 161.1 (quart. C); C₂₃H₁₉BrN₂S (435.38); ber. C 63.45, H 4.40, N 6.43, S 7.37; gef. C 63.34, H 4.59, N 6.05, S 7.26; HPLC: 97.6% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm, *t*_N = 3.78 min, *t*_M = 1.09 min (ACN/H₂O; 80:20), λ_{max}: 271 nm, 325 nm.

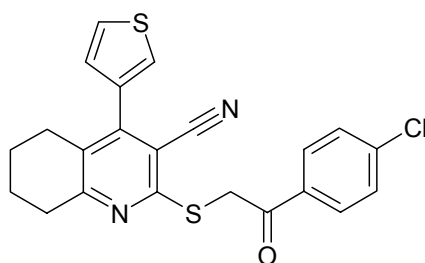
2-[(2-Oxo-2-phenylethyl)sulfanyl]-4-(3-thienyl)-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-3-carbonitril (**52a**)

Nach AAV 7 aus 4-(3-Thienyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72k**) (49.3 mg, 0.181 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (101 µl, 0.181 mmol) und 2-Brom-

1-phenylethanon (36.0 mg, 0.181 mmol). Man erhält 61.9 mg (88%) eines graugrünen Pulvers.

Schmp.: 123-124 °C; IR (KBr): 2970 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} und 2867 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2218 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1685 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 1.61-1.68 (m, 2 H, CH_2), 1.71-1.78 (m, 2 H, CH_2), 2.45 (t, 2 H, $J = 6.3$ Hz, CH_2), 2.64 (t, 2 H, $J = 6.6$ Hz, CH_2), 4.64 (s, 2 H, CH_2), 7.06 (dd, 1 H, $J = 5.1/1.3$ Hz, Thiophen-H), 7.36 (dd, 1 H, $J = 3.0/1.3$ Hz, Thiophen-H), 7.45 (dd, 1 H, $J = 5.1/3.0$ Hz, Thiophen-H), 7.49-7.54 (m, 2 H, ArH), 7.60-7.64 (m, 1 H, ArH), 8.07-8.10 (m, 2 H, ArH); ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.7, 20.9, 25.3, 31.7, 36.2 (sek. C); 125.8, 126.4, 127.1, 127.4 (2 C), 127.9 (2 C), 132.6 (tert. C); 102.9, 114.7, 126.3, 133.6, 135.7, 148.3, 156.0, 160.2, 192.9 (quart. C); $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}_2$ (390.52); ber. C 67.66, H 4.65, N 7.17, S 16.42; gef. C 67.49, H 4.74, N 7.22, S 16.41; HPLC: 99.1% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm, $t_N = 4.71$ min, $t_M = 1.04$ min (ACN/ H_2O ; 70:30), λ_{max} : 258 nm, 324 nm.

2-{[2-(4-Chlorphenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl}-4-(3-thienyl)-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-3-carbonitril (**52b**)

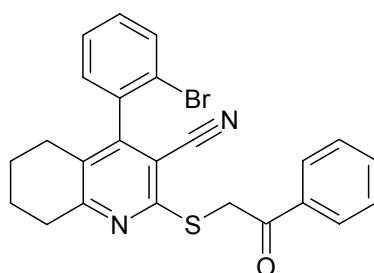


Nach AAV 7 aus 4-(3-Thienyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72k**) (68.3 mg, 0.251 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (140 μl , 0.250 mmol) und 2-Brom-1-(4-chlorphenyl)ethanon (58.3 mg, 0.250 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 70.1 mg (66%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 179-180 °C; IR (KBr): 2936 cm^{-1} , 2906 cm^{-1} und 2862 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2216 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1702 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ (ppm) = 1.55-1.61 (m, 2 H, CH_2), 1.65-1.70 (m, 2 H, CH_2), 2.41 (t, 2 H, $J = 6.3$ Hz, CH_2), 4.80 (s, 2 H, CH_2), 7.23 (dd, 1 H, $J = 5.1/1.3$ Hz, Thiophen-H), 7.66 (m, 2 H, Teil eines $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems, ArH), 7.75 (dd, 1 H, $J = 5.1/2.8$ Hz, Thiophen-H), 7.80 (dd, 1 H, $J = 2.8/1.3$ Hz, Thiophen-H), 8.11 (m, 2 H, Teil eines $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems, ArH), 2 H (5,6,7,8-Tetrahydrochinolin) nicht detektiert,

überlagert mit DMSO-Peak; ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.4, 21.7, 26.0, 32.4, 36.8 (sek. C); 126.6, 127.2, 127.8, 128.8 (2 C), 130.1 (2 C) (tert. C); 103.6, 115.4, 127.0, 134.3, 135.1, 138.2, 149.1, 156.6, 160.9, 192.9 (quart. C); $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{OS}_2$ [424.97]; ber. C 62.18, H 4.03, N 6.59, S 15.09; gef. C 61.84, H 4.12, N 6.82, S 14.88; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 98.7% bei 280 nm, t_N = 3.51 min, t_M = 1.07 min (ACN/ H_2O ; 75:25), λ_{max} : 259 nm, 323 nm.

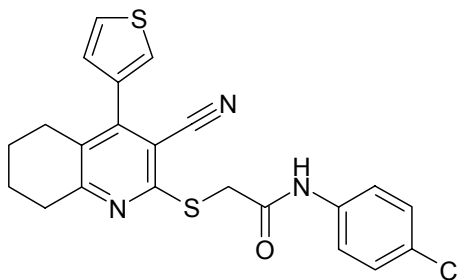
4-(2-Bromphenyl)-2-[(2-oxo-2-phenylethyl)sulfanyl]-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-3-carbonitril
(**52c**)



Nach AAV 7 aus 4-(2-Bromphenyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72d**) (70.5 mg, 0.204 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (114 μl , 0.204 mmol) und 2-Brom-1-phenylethanon (40.7 mmg, 0.204 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 45.5 mg (48%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 129-130 °C; IR (KBr): 3062 cm^{-1} (CH aromatisch), 2932 cm^{-1} , 2902 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2215 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1695 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.54-1.67 (m, 4 H, 2x CH_2), 2.10-2.24 (m, 2 H, CH_2), 2.47-2.58 (m, 2 H, CH_2 , teilweise überlagert vom DMSO-Signal), 4.82 (d, 1 H, J = 16.8 Hz, CH), 4.92 (d, 1 H, J = 16.6 Hz, CH), 7.40 (dd, 1 H, J = 7.5/1.5 Hz, ArH), 7.45-7.48 (m, 1 H, ArH), 7.56-7.61 (m, 3 H, ArH), 7.69-7.72 (m, 1 H, ArH), 7.84 (d, 1 H, J = 8.1 Hz, ArH), 8.11-8.12 (m, 2 H, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.4, 21.4, 25.5, 32.3, 36.9 (sek. C); 128.2 (2 C), 128.4, 128.7 (2 C), 129.8, 131.2, 132.7, 133.3 (tert. C); 103.4, 114.6, 120.8, 126.6, 135.7, 136.3, 152.5, 156.7, 161.6, 193.6 (quart. C); $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{OS}$ (463.39); ber. C 62.21, H 4.13, N 6.05, S 6.92; gef. C 62.20, H 4.19, N 6.08, S 6.64; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm, t_N = 2.60 min, t_M = 1.03 min (ACN/ H_2O ; 80:20), λ_{max} : 263 nm, 323 nm.

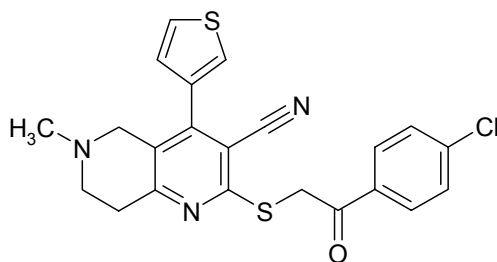
N-(4-Chlorphenyl)-2-[[3-cyan-4-(3-thienyl)-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2-yl]-sulfanyl]-acetamid (**52d**)



Nach AAV 7 aus 4-(3-Thienyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72k**) (68.1 mg, 0.250 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (140 µl, 0.250 mmol) und 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (51.1 mg, 0.250 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 66.6 mg (61%) zitronengelbe Nadeln.

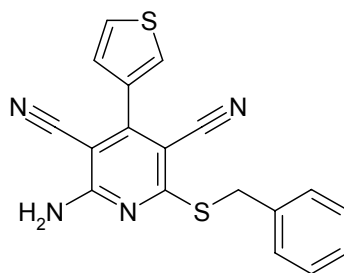
Schmp.: 204-205 °C; IR (KBr): 3284 cm⁻¹ und 3251 cm⁻¹ (NH), 3109 cm⁻¹ und 3095 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2940 cm⁻¹, 2900 cm⁻¹ und 2867 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2215 cm⁻¹ (C≡N), 1673 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.60-1.64 (m, 2 H, CH₂), 1.72-1.76 (m, 2 H, CH₂), 2.44 (t, 2 H, *J* = 6.4 Hz, CH₂), 2.80 (t, 2 H, *J* = 6.4 Hz, CH₂), 4.16 (s, 2 H, CH₂), 7.25 (dd, 1 H, *J* = 5.1/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.38-7.40 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.62-7.64 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.77 (dd, 1 H, *J* = 5.1/2.8 Hz, Thiophen-H), 7.81 (dd, 1 H, *J* = 2.8/1.3 Hz, Thiophen-H), 10.49 (s, 1 H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.5, 21.7, 26.0, 32.8, 34.8 (sek. C); 120.4 (2 C), 126.6, 127.1, 127.8, 128.6 (2 C) (tert. C); 103.6, 115.3, 126.7, 127.0, 134.3, 137.9, 149.0, 157.1, 161.0, 166.2 (quart. C); C₂₂H₁₈ClN₃OS₂ (439.98); ber. C 60.06, H 4.12, N 9.55, S 14.58; gef. C 59.99, H 4.20, N 9.50, S 14.45; HPLC: 98.9% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm, *t*_N = 3.71 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 70:30), λ_{max}: 221 nm, 258 nm, 322 nm.

2-{[2-(4-Chlorphenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl}-6-methyl-4-(3-thienyl)-5,6,7,8-tetrahydro[1,6]-naphthyridin-3-carbonitril (**53**)



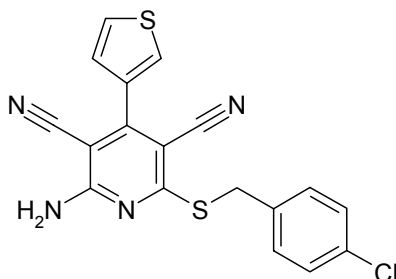
Nach AAV 7 aus 6-Methyl-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydro[1,6]naphthyridin-3-carbonitril (**73k**) (69.0 mg, 0.240 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (134 μ l, 0.240 mmol) und 2-Brom-1-(4-chlorphenyl)ethanon (57.8 mg, 0.248 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 63.2 mg (60%) eines orangefarbenen Pulvers.

Schmp.: 194-195 °C; IR (KBr): 3118 cm^{-1} (CH aromatisch), 2964 cm^{-1} und 2937 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2839 cm^{-1} und 2758 cm^{-1} (CH in N-CH₃), 2212 cm^{-1} (C \equiv N), 1671 cm^{-1} (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.25 (s, 3 H, CH₃), 2.60 (s, 4 H, 2xCH₂), 3.23 (s, 2 H, CH₂), 4.83 (s, 2 H, CH₂), 7.28 (dd, 1 H, *J* = 4.9/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.65-7.67 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.79 (dd, 1 H, *J* = 4.9/2.8 Hz, Thiophen-H), 7.88 (dd, 1 H, *J* = 2.8/1.3 Hz, Thiophen-H), 8.10-8.12 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.1, 36.9, 50.9, 54.2 (sek. C); 45.1 (CH₃); 127.0, 127.5, 127.7, 128.8 (2 C), 130.1 (2 C) (tert. C); 103.5, 115.2, 124.7, 133.2, 135.0, 138.2, 147.2, 157.8, 158.4, 192.8 (quart. C); C₂₂H₁₈ClN₃OS₂ (439.98); ber. C 60.06, H 4.12, N 9.55, S 14.58; gef. C 60.20, H 4.40, N 9.17, S 14.26; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, *t*_N = 2.06 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O+(Et₃N)₂SO₄; 40:60), λ_{max} : 264 nm, 321 nm.

2-Amino-6-(benzylsulfanyl)-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (**54a**)

Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (90.4 mg, 0.350 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (196 μ l, 0.350 mmol) und Benzylbromid (41.6 μ l, 0.350 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 48.7 mg (40%) eines hellbeigen Pulvers.

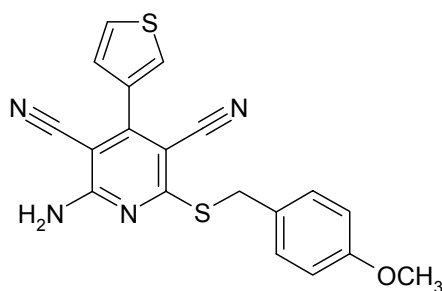
Schmp.: 207-208 °C; IR (KBr): 3440 cm^{-1} , 3326 cm^{-1} und 3216 cm^{-1} (NH), 2219 cm^{-1} und 2207 cm^{-1} (C \equiv N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 4.50 (s, 2 H, CH $_2$), 7.23-7.28 (m, 1 H, ArH), 7.30-7.34 (m, 2 H, ArH), 7.37 (dd, 1 H, J = 5.1/1.5 Hz, Thiophen-H), 7.49-7.52 (m, 2 H, ArH), 7.76 (dd, 1 H, J = 5.1/2.8 Hz, Thiophen-H), 8.03 (dd, 1 H, J = 2.8/1.5 Hz, Thiophen-H), 8.10 (br s, 2 H, NH $_2$, überlagert mit dd bei 8.03 ppm); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 33.0 (CH $_2$); 127.2, 127.3, 127.6, 128.3 (2 C), 128.7, 129.3 (2 C) (tert. C); 85.3, 92.7, 115.3, 115.4, 133.3, 137.5, 153.0, 159.6, 166.3 (quart. C); C $_{18}$ H $_{12}$ N $_4$ S $_2$ (348.45); ber. C 62.04, H 3.47, N 16.08, S 18.41; gef. C 62.15, H 3.60, N 15.87, S 18.15; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, t_N = 7.35 min, t_M = 1.03 min (ACN/H $_2$ O; 50:50), λ_{max} : 255 nm, 283 nm, 348 nm.

2-Amino-6-[(4-chlorbenzyl)sulfanyl]-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (**54b**)

Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (104 mg, 0.401 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (224 μ l, 0.400 mmol) und 4-Chlorbenzylbromid (83.3 mg, 0.405 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 73.9 mg (48%) beige Kristalle.

Schmp.: 217-219 °C; IR (KBr): 3468 cm⁻¹, 3352 cm⁻¹ und 3214 cm⁻¹ (NH), 2210 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 4.48 (s, 2 H, CH₂), 7.35-7.38 (m, 3 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH, überlagert mit Thiophen-H), 7.54-7.58 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.76 (dd, 1 H, *J* = 5.1/3.0 Hz, Thiophen-H), 8.03 (dd, 1 H, *J* = 3.0/1.3 Hz, Thiophen-H), 8.10 (br s, 2 H, NH₂, Überlagerung mit dd bei 8.03 ppm); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 32.3 (CH₂); 127.3, 127.7, 128.2 (2 C), 128.7, 131.2 (2 C) (tert. C); 85.5, 92.9, 115.3, 115.4, 131.8, 133.4, 136.9, 153.1, 159.6, 166.1 (quart. C); C₁₈H₁₁ClN₄S₂ (382.89); ber. C 56.46, H 2.90, N 14.63, S 16.75; gef. C 56.58, H 2.99, N 14.96, S 16.66; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, *t*_N = 4.01 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 223 nm, 254 nm, 280 nm, 348 nm.

2-Amino-6-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (**54c**)

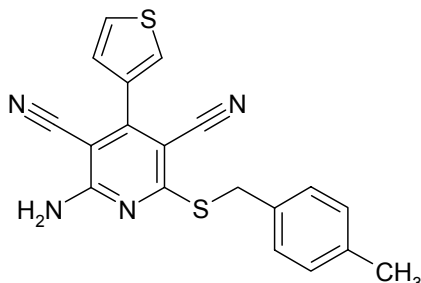


Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (103 mg, 0.400 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (224 µl, 0.400 mmol) und 4-Methoxybenzylbromid (57.7 µl, 0.400 mmol). Man erhält 111 mg (74%) eines hellgrauen Pulvers.

Schmp.: 208-209 °C; IR (KBr): 3439 cm⁻¹, 3348 cm⁻¹ und 3238 cm⁻¹ (NH), 2212 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.73 (s, 3 H, OCH₃), 4.45 (s, 2 H, CH₂), 6.85-6.89 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.37 (dd, 1 H, *J* = 5.1/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.41-7.45 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.76 (dd, 1 H, *J* = 5.1/3.0 Hz, Thiophen-H), 8.03 (dd, 1 H, *J* = 3.0/1.3 Hz, Thiophen-H), 8.08 (br s, 2 H, NH₂, überlagert mit dd bei 8.03 ppm); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 32.7 (CH₂); 54.9 (OCH₃); 113.7 (2 C), 127.3, 127.6, 128.7, 130.5 (2 C) (tert. C); 85.2, 92.7, 115.4, 115.4, 129.2, 133.3, 152.9, 158.4, 159.6, 166.5 (quart. C); C₁₉H₁₄N₄OS₂ (378.47); ber. C 60.30, H 3.73, N 14.80, S 16.94; gef. C 60.69, H 3.87, N 14.63, S 16.69; HPLC: 99.2% bei

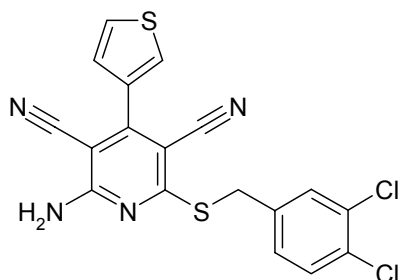
254 nm und 98.7% bei 280 nm, $t_N = 2.50$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{\max} : 230 nm, 254 nm, 348 nm.

2-Amino-6-[(4-methylbenzyl)sulfanyl]-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (**54d**)



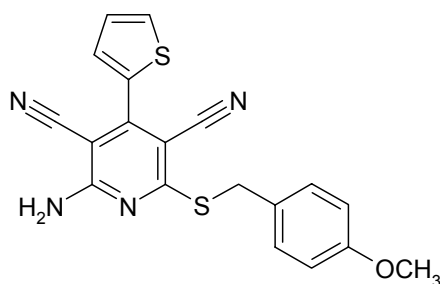
Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (97.2 mg, 0.376 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (211 μ l, 0.376 mmol) und 4-Methylbenzylbromid (69.6 mg, 0.376 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 63.2 mg (46%) beige Nadeln.

Schmp.: 204-206 °C; IR (KBr): 3459 cm^{-1} , 3339 cm^{-1} und 3227 cm^{-1} (NH), 2218 cm^{-1} und 2208 cm^{-1} (C \equiv N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.27 (s, 3 H, CH₃), 4.45 (s, 2 H, CH₂), 7.12 (d, 2 H, $J = 7.8$ Hz, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.36 (dd, 1 H, $J = 5.1/1.3$ Hz, Thiophen-H), 7.38 (d, 2 H, $J = 7.8$ Hz, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH, Überlagerung mit dd bei 7.36 ppm), 7.76 (dd, 1 H, $J = 5.1/3.0$ Hz, Thiophen-H), 8.03 (dd, 1 H, $J = 3.0/1.3$ Hz, Thiophen-H), 8.06 (br s, 2 H, NH₂, Überlagerung mit dd bei 8.03 ppm); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 20.7 (CH₃); 33.0 (CH₂); 127.3, 127.7, 128.7, 128.9 (2 C), 129.2 (2 C) (tert. C); 85.4, 92.9, 115.4, 115.4, 133.4, 134.3, 136.5, 153.0, 159.6, 166.5 (quart. C); C₁₉H₁₄N₄S₂ (362.47); ber. C 62.96, H 3.89, N 15.46, S 17.69; gef. C: 63.11, H 4.03, N 15.66, S 17.34; HPLC: 98.7% bei 254 nm und 99.0% bei 280 nm, $t_N = 3.77$ min, $t_M = 1.04$ min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{\max} : 254 nm, 348 nm.

2-Amino-6-[(3,4-dichlorobenzyl)sulfanyl]-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (**54e**)

Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (63.7 mg, 0.247 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (138 μ l, 0.247 mmol) und 3,4-Dichlorbenzylbromid (59.3 mg, 0.247 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 53.8 mg (52%) eines hellgrauen Pulvers.

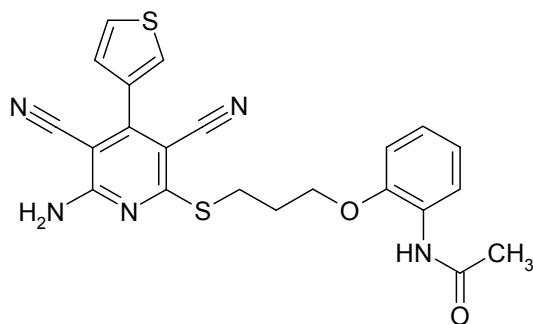
Schmp.: 215-218 °C; IR (KBr): 3469 cm^{-1} , 3348 cm^{-1} und 3223 cm^{-1} (NH), 2214 cm^{-1} (C \equiv N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 4.48 (s, 2 H, CH₂), 7.37 (dd, 1 H, J = 5.1/1.5 Hz, Thiophen-H), 7.53-7.58 (m, 2 H, ArH), 7.76 (dd, 1 H, J = 5.1/3.0 Hz, Thiophen-H), 7.86 (d, 1 H, J = 1.3 Hz, ArH), 8.03 (dd, 1 H, J = 3.0/1.5 Hz, Thiophen-H), 8.11 (br s, 2 H, NH₂, überlagert mit dd bei 7.76 ppm, d bei 7.86 ppm und dd bei 8.03 ppm); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.6 (CH₂); 127.3, 127.6, 128.7, 129.8, 130.3, 131.3 (tert. C); 85.5, 92.7, 115.3, 115.3, 129.7, 130.6, 133.3, 139.3, 153.0, 159.5, 165.7 (quart. C); C₁₈H₁₀Cl₂N₄S₂ (417.33); ber. C 51.80, H 2.42, N 13.42, S 15.37; gef. C 51.79, H 2.56, N 13.31, S 15.12; HPLC: 98.2% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm, t_N = 5.78 min, t_M = 1.04 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max} : 254 nm, 282 nm, 348 nm.

2-Amino-6-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]-4-(2-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (**54f**)

Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(2-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62j**) (106 mg, 0.411 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (230 μ l, 0.411 mmol) und 4-Methoxybenzylbromid (59.2 μ l, 0.411 mmol). Man erhält 131.4 mg (84%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 221-222 °C; IR (KBr): 3409 cm⁻¹, 3340 cm⁻¹ und 3237 cm⁻¹ (NH), 2210 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.73 (s, 3 H, OCH₃), 4.45 (s, 2 H, CH₂), 6.85-6.89 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.27 (dd, 1 H, *J* = 5.1/3.8 Hz, Thiophen-H), 7.41-7.45 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.55 (dd, 1 H, *J* = 3.8/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.94 (dd, 1 H, *J* = 5.1/1.3 Hz, Thiophen-H), 8.16 (br s, 2 H, NH₂, überlagert mit dd bei 7.94 ppm); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.8 (CH₂); 54.9 (OCH₃); 113.7 (2 C), 127.8, 130.5 (2 C), 130.7, 131.1 (tert. C); 85.5, 92.9, 115.3, 115.3, 129.0, 132.6, 150.5, 158.4, 159.6, 166.9 (quart. C); C₁₉H₁₄N₄OS₂ (378.47); ber. C 60.30, H 3.73, N 14.80; gef. C 60.10, H 3.85, N 14.96; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm, *t*_N = 2.59 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 230 nm, 256 nm, 295 nm, 354 nm.

N-[2-(3-{[6-Amino-3,5-dicyan-4-(3-thienyl)pyridin-2-yl]sulfanyl}propoxy)phenyl]acetamid
(54g)

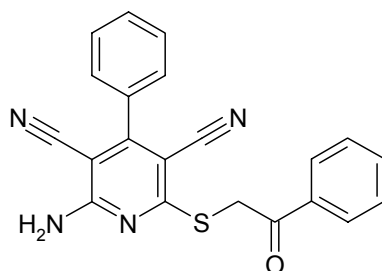


Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (77.5 mg, 0.300 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (168 µl, 0.300 mmol) und *N*-[2-(3-Brompropoxy)phenyl]acetamid (**109**) (81.6 mg, 0.300 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 83.5 mg (62%) eines hellgrauen Pulvers.

Schmp.: 184-185 °C; IR (KBr): 3464 cm⁻¹, 3414 cm⁻¹, 3283 cm⁻¹ und 3199 cm⁻¹ (NH), 2962 cm⁻¹ und 2926 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2203 cm⁻¹ (C≡N), 1677 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.10 (s, 3 H, CH₃), 2.18 (quin, 2 H, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 3.41 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz, CH₂), 4.14 (t, 2 H, *J* = 6.2 Hz, CH₂), 6.88-6.91 (m, 1 H, ArH), 7.03-7.07 (m, 2 H, ArH), 7.39 (dd, 1 H, *J* = 4.9/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.75-8.55 (br s, 2 H, NH₂, Überlagerung mit dd bei 7.78 ppm, d bei 7.88 ppm und dd bei 8.05 ppm), 7.78 (dd, 1 H, *J* = 4.9/2.8 Hz, Thiophen-H), 7.88 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 8.05 (dd, 1 H, *J* = 2.8/1.3 Hz, Thiophen-H), 9.00 (s, 1 H, Amid-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 23.4 (CH₃); 26.1,

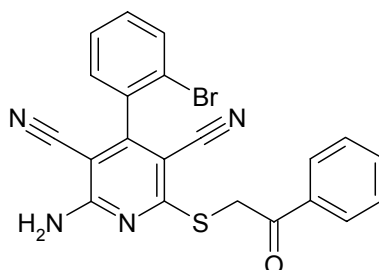
28.0, 66.3 (sek. C); 111.5, 119.8, 121.9, 123.9, 126.9, 127.3, 128.3 (tert. C); 84.7, 92.7, 115.0, 115.2, 133.0, 148.4, 152.5, 159.4, 161.8, 166.6, 168.0 (quart. C); $C_{22}H_{19}N_5O_2S_2$ (449.55); ber. C 58.78, H 4.26, N 15.58, S 14.27; gef. C 58.51, H 4.31, N 15.25, S 13.89; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm, $t_N = 3.83$ min, $t_M = 1.02$ min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max} : 251 nm, 281 nm, 347 nm.

2-Amino-6-[(2-oxo-2-phenylethyl)sulfanyl]-4-phenylpyridin-3,5-dicarbonitril (**55a**)



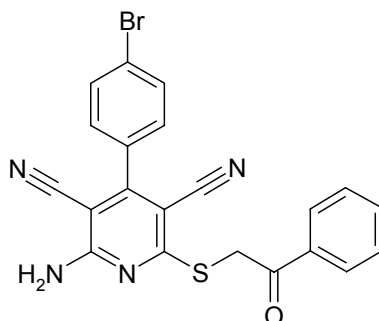
Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-phenyl-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62a**) (99.7 mg, 0.301 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (168 μ l, 0.301 mmol) und 2-Brom-1-phenylethanon (80.6 mg, 0.301 mmol). Man erhält 92.6 mg (77%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 247-248 °C (Lit.: 250-253 °C)¹¹⁶; IR (KBr): 3471 cm^{-1} , 3345 cm^{-1} und 3211 cm^{-1} (NH), 2924 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2208 cm^{-1} (C \equiv N), 1677 cm^{-1} (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 5.02 (s, 2 H, CH₂), 7.54-7.61 (m, 7 H, ArH), 7.71 („t“, 1 H, $J = 7.5$ Hz, ArH), 7.95 (br s, 2 H, NH₂), 8.09 (d, 2 H, $J = 7.1$ Hz, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 37.9 (CH₂); 128.3 (2 C), 128.4 (2 C), 128.6 (2 C), 128.8 (2 C), 130.4, 133.7 (tert. C); 86.1, 93.4, 115.1, 115.3, 133.9, 135.6, 158.4, 159.5, 165.8, 192.8 (quart. C); $C_{21}H_{14}N_4OS$ (370.43); ber. C 68.09, H 3.81, N 15.12, S 8.66; gef. C 68.14, H 3.95, N 15.16, S 8.35; HPLC: 98.2% bei 254 nm und 97.1% bei 280 nm, $t_N = 5.33$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max} : 249 nm, 291 nm, 343 nm. IR- und ¹H-NMR-Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.¹¹⁶

2-Amino-4-(2-bromphenyl)-6-[(2-oxo-2-phenylethyl)sulfanyl]pyridin-3,5-dicarbonitril (**55b**)

Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(2-bromphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62d**) (142 mg, 0.427 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (239 μ l, 0.427 mmol) und 2-Brom-1-phenylethanon (85.1 mg, 0.428 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 65.2 mg (34%) eines hellgrauen Pulvers.

Schmp.: 223-224 °C; IR (KBr): 3535 cm^{-1} , 3467 cm^{-1} , 3335 cm^{-1} und 3208 cm^{-1} (NH), 2966 cm^{-1} und 2918 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2214 cm^{-1} (C \equiv N), 1681 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 5.04 („d“, 2 H, J = 1.8 Hz, CH $_2$), 7.49-7.62 (m, 5 H, ArH), 7.69-7.74 (m, 1 H, ArH), 7.85 (dd, 1 H, J = 8.1/1.0 Hz, ArH), 7.90-8.40 (br s, 2 H, NH $_2$ und m, 2 H, ArH; Überlagerung der Signale); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 36.9 (CH $_2$); 127.2, 127.3 (2 C), 127.7 (2 C), 128.9, 130.9, 131.8, 132.6 (tert. C); 85.5, 92.6, 113.2, 113.5, 119.5, 133.9, 134.3, 156.6, 158.0, 164.6, 191.5 (quart. C); C $_{21}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{OS}$ (449.32); ber. C 56.13, H 2.92, N 12.47, S 7.14; gef. C 55.94, H 3.24, N 12.21, S 6.90; HPLC: 98.4% bei 254 nm und 98.7% bei 280 nm, t_N = 2.89 min, t_M = 1.03 min (ACN/H $_2$ O; 55:45), λ_{max} : 246 nm, 293 nm, 344 nm.

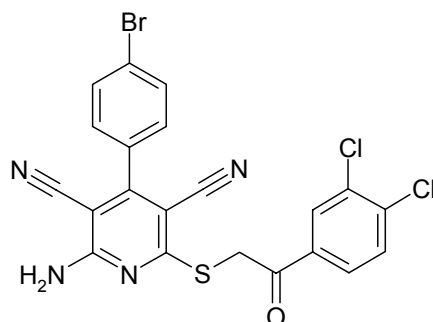
2-Amino-4-(4-bromphenyl)-6-[2-oxo-2-phenylethyl)sulfanyl]pyridin-3,5-dicarbonitril (**55c**)

Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(4-bromphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62i**) (99.6 mg, 0.301 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (168 μ l, 0.300 mmol) und 2-

Brom-1-phenylethanon (85.1 mg, 0.301 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 57.4 mg (43%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 261-262 °C; IR (KBr): 3400 cm^{-1} , 3321 cm^{-1} und 3230 cm^{-1} (NH), 2216 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1692 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 5.03 (s, 2 H, CH_2), 7.53-7.55 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.58-7.61 (m, 2 H, ArH), 7.70-7.73 (m, 1 H, ArH), 7.76-8.35 (br s, 2 H, NH_2 , Überlagerung mit m bei 7.80-7.82 ppm und m bei 8.08-8.10 ppm), 7.80-7.82 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 8.08-8.10 (m, 2 H, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 37.9 (CH_2); 128.4 (2 C), 128.8 (2 C), 130.6 (2 C), 131.7 (2 C), 133.7 (tert. C); 85.9, 93.0, 115.0, 115.2, 124.1, 133.0, 135.4, 157.2, 159.3, 165.8, 192.6 (quart. C); $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{OS}$ (449.32); ber. C 56.13, H 2.92, N 12.47, S 7.14; gef. C 55.85, H 3.02, N 12.59, S 6.90; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm, t_N = 3.14 min, t_M = 1.02 min (ACN/ H_2O ; 60:40), λ_{max} : 250 nm, 345 nm.

2-Amino-4-(4-bromphenyl)-6-{[2-(3,4-dichlorphenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl}pyridin-3,5-dicarbonitril (**55d**)

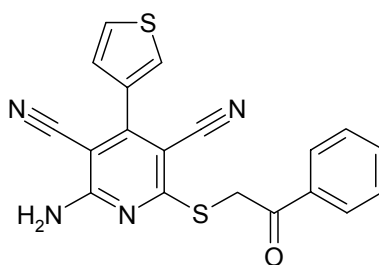


Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(4-bromphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (99.7 mg, 0.301 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (168 μl , 0.300 mmol) und 2-Brom-1-(3,4-dichlorphenyl)ethanon (80.6 mg, 0.301 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 56.4 mg (34%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 234-235 °C; IR (KBr): 3404 cm^{-1} , 3323 cm^{-1} und 3230 cm^{-1} (NH), 2218 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1692 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.13 MHz): δ (ppm) = 4.97 (s, 2 H, CH_2), 7.53-7.55 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.60-8.25 (br s, 2 H, NH_2 , Überlagerung mit m bei 7.80-7.82 ppm, d bei 7.88 und dd bei 8.03), 7.80-7.82 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.88 (d, 1 H, J = 8.5 Hz, ArH), 8.03 (dd, 1 H, J = 8.5/2.1 Hz, ArH), 8.29 (d, 1 H, J = 2.1 Hz, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 37.1

(CH₂); 127.4, 129.4, 129.6 (2 C), 130.1, 130.8 (2 C) (tert. C); 84.9, 92.0, 114.0, 114.3, 123.2, 130.8, 132.0, 134.7, 135.4, 156.2, 158.3, 164.6, 189.8 (quart. C); C₂₁H₁₁BrCl₂N₄OS (518.21); ber. C 48.67, H 2.14, N 10.81, S 6.19; gef. C 48.90, H 2.25, N 10.72, S 6.23; HPLC: 98.1% bei 254 nm und 97.1% bei 280 nm, t_N = 2.55 min, t_M = 1.06 min (ACN/H₂O; 70:30), λ_{max}: 253 nm, 345 nm.

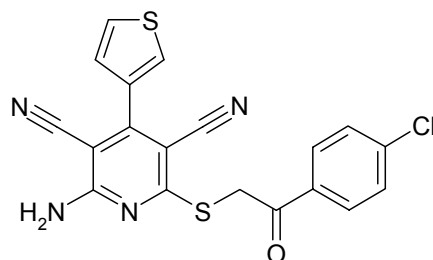
2-Amino-6-[(2-oxo-2-phenylethyl)sulfanyl]-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (**55e**)



Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (104 mg, 0.401 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (224 µl, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-phenylethanon (79.7 mg, 0.400 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 98.3 mg (65%) eines hellgrauen Pulvers.

Schmp.: 265-268 °C; IR (KBr): 3471 cm⁻¹, 3340 cm⁻¹ und 3212 cm⁻¹ (NH), 3097 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2210 cm⁻¹ (C≡N), 1676 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 5.01 (s, 2 H, CH₂), 7.41 (dd, 1 H, *J* = 5.1/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.57-7.61 (m, 2 H, ArH), 7.69-7.73 (m, 1 H, ArH), 7.79 (dd, 1 H, *J* = 5.1/3.0 Hz, Thiophen-H), 7.92 (br s, 2 H, NH₂), 8.07-8.09 (m, 3 H, ArH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 37.5 (CH₂); 126.9, 127.2, 127.9 (2 C), 128.3 (2 C), 128.4, 133.2 (tert. C); 84.9, 92.4, 114.8, 115.0, 132.8, 135.0, 152.4, 159.1, 165.5, 192.2 (quart. C); C₁₉H₁₂N₄OS₂ (376.46); ber. C 60.62, H 3.21, N 14.88, S 17.04; gef. C 60.48, H 3.29, N 14.76, S 16.96; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm, t_N = 2.87 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max}: 250 nm, 280 nm, 346 nm.

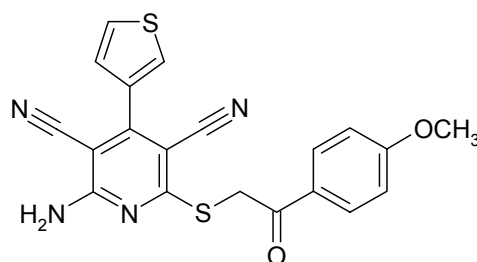
2-Amino-6-{[2-(4-chlorophenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl}-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril
(55f)



Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (103 mg, 0.400 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (224 µl, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-(4-chlorphenyl)ethanon (93.4 mg, 0.400 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 93.8 mg (57%) eines grauweißen Pulvers.

Schmp.: 243-244 °C; IR (KBr): 3438 cm⁻¹, 3334 cm⁻¹ und 3224 cm⁻¹ (NH), 2208 cm⁻¹ (Doppelpeak, C≡N), 1687 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 4.97 (s, 2 H, CH₂), 7.41 (dd, 1 H, *J* = 5.1/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.64-7.67 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.78 (dd, 1 H, *J* = 5.1/3.0 Hz, Thiophen-H), 7.90 (br s, 2 H, NH₂), 8.07-8.10 (m, 3 H, Teil eines AA'XX'-Systems und Thiophen-H überlagert); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 37.9 (CH₂); 127.4, 127.7, 128.9, 128.9 (2 C), 130.3 (2 C) (tert. C); 85.6, 92.9, 115.3, 115.5, 133.3, 134.3, 138.6, 153.0, 159.6, 165.9, 191.8 (quart. C); C₁₉H₁₁ClN₄OS₂ (410.90); ber. C 55.54, H 2.70, N 13.64, S 15.61; gef. C 55.87, H 2.81, N 13.47, S 15.57; HPLC: 99.2% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm, *t*_N = 4.66 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max}: 254 nm, 346 nm.

2-Amino-6-{[2-(4-methoxyphenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl}-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril
(55g)

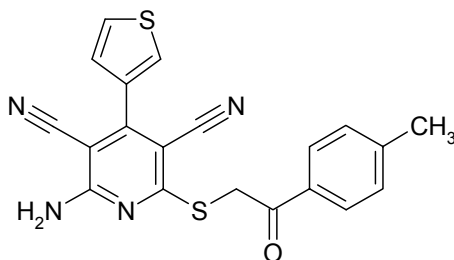


Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (104 mg, 0.401 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (224 µl, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-

(4-methoxyphenyl)ethanon (91.7 mg, 0.400 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 116 mg (71%) eines grauweißen Pulvers.

Schmp.: 250-252 °C; IR (KBr): 3390 cm^{-1} , 3321 cm^{-1} und 3217 cm^{-1} (NH), 3109 cm^{-1} (CH aromatisch), 2899 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2210 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1672 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 4.95 (s, 2 H, CH_2), 7.09-7.10 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.41 (dd, 1 H, $J = 5.1/1.3$ Hz, Thiophen-H), 7.79 (dd, 1 H, $J = 5.1/3.0$ Hz, Thiophen-H), 7.93 (br s, 2 H, NH_2 , überlagert mit dd bei 7.79, m bei 8.05-8.06 und dd bei 8.08), 8.05-8.06 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 8.08 (dd, 1 H, $J = 3.0/1.3$ Hz, Thiophen-H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 37.5 (CH_2); 55.5 (OCH_3); 113.9 (2 C), 127.3, 127.6, 128.8, 130.8 (2 C) (tert. C); 85.4, 92.9, 115.3, 115.5, 128.3, 133.3, 152.9, 159.5, 163.5, 166.1, 191.0 (quart. C); $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$ (406.48); ber. C 59.10, H 3.47, N 13.78, S 15.78; gef. C 59.00, H 3.61, N 14.04, S 15.44; HPLC: 99.7% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, $t_N = 4.83$ min, $t_M = 1.01$ min (ACN/ H_2O ; 50:50), λ_{max} : 285 nm, 347 nm.

2-Amino-6-([2-(4-methylphenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl)-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril
(55h)

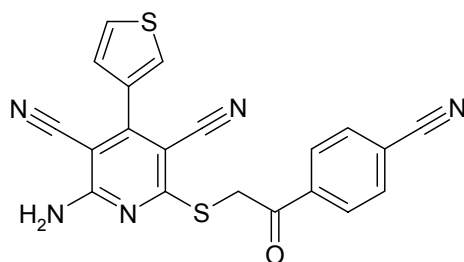


Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (103 mg, 0.400 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (224 μl , 0.400 mmol) und 2-Brom-1-(4-methylphenyl)ethanon (85.4 mg, 0.401 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 110 mg (70%) hellgelbe Nadeln.

Schmp.: 234-235 °C; IR (KBr): 3423 cm^{-1} , 3325 cm^{-1} und 3221 cm^{-1} (NH), 3114 cm^{-1} (CH aromatisch), 2210 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1681 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.41 (s, 3 H, CH_3), 4.97 (s, 2 H, CH_2), 7.38-7.40 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.41 (dd, 1 H, $J = 5.1/1.5$ Hz, Thiophen-H, überlagert mit m bei 7.38-7.40), 7.79 (dd, 1 H, $J = 5.1/3.0$ Hz, Thiophen-H), 7.91 (br s, 2 H, NH_2 , überlagert mit dd bei 7.79, m bei 7.97-

7.99 und dd bei 8.08), 7.97-7.99 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 8.08 (dd, 1 H, $J = 3.0/1.5$ Hz, Thiophen-H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.1 (CH_3); 37.7 (CH_2); 127.3, 127.6, 128.5 (2 C), 128.8, 129.3 (2 C) (tert. C); 85.4, 92.9, 115.3, 115.5, 133.0, 133.3, 144.1, 152.9, 159.5, 166.0, 192.2 (quart. C); $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OS}_2$ (390.48); ber. C 61.52, H 3.61, N 14.35, S 16.42; gef. C 61.45, H 3.73, N 14.73, S 16.16; HPLC: 99.8% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, $t_N = 3.77$ min, $t_M = 1.02$ min (ACN/ H_2O ; 55:45), λ_{max} : 255 nm, 347 nm.

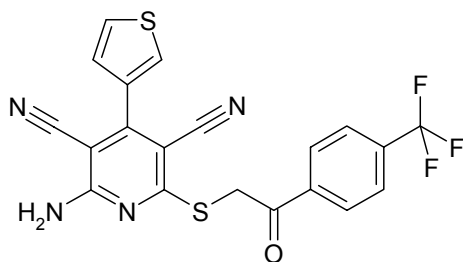
2-Amino-6-{[2-(4-cyanophenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl}-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (**55i**)



Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (104 mg, 0.401 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (224 μl , 0.400 mmol) und 4-(Bromacetyl)benzonitril (89.7 mg, 0.400 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 106 mg (65%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: Zersetzung ab 264 °C; IR (KBr): 3434 cm^{-1} , 3330 cm^{-1} und 3213 cm^{-1} (NH), 3110 cm^{-1} und 3094 cm^{-1} (CH aromatisch), 2945 cm^{-1} und 2900 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2213 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1695 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 5.00 (s, 2 H, CH_2), 7.41 (dd, 1 H, $J = 4.9/1.3$ Hz, Thiophen-H), 7.79 (dd, 1 H, $J = 4.9/2.8$ Hz, Thiophen-H), 7.89 (br s, 2 H, NH_2 , überlagert mit dd bei 7.79 und m bei 8.06-8.08), 8.06-8.08 (m, 3 H, ArH), 8.20-8.22 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 38.1 (CH_2); 127.4, 127.6, 128.8, 128.9 (2 C), 132.7 (2 C) (tert. C); 85.5, 92.8, 115.2, 115.4, 115.4, 118.1, 133.2, 138.8, 152.9, 159.5, 165.7, 192.1 (quart. C); $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{OS}_2$ (401.47); ber. C 59.83, H 2.76, N 17.44, S 15.97; gef. C 59.65, H 2.89, N 17.53, S 15.75; HPLC: 99.3 bei 254 nm und 99.3 bei 280 nm, $t_N = 3.99$, $t_M = 1.02$ min (ACN/ H_2O ; 50:50), λ_{max} : 250 nm, 280 nm, 347 nm.

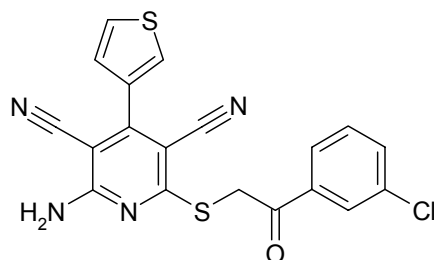
2-Amino-6-({2-oxo-2-[4-(trifluormethyl)phenyl]ethyl}sulfanyl)-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (**55j**)



Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (103 mg, 0.400 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (224 μ l, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-[4-(trifluormethyl)phenyl]ethanon (107 mg, 0.400 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 88.7 mg (50%) hellgelbe Kristalle.

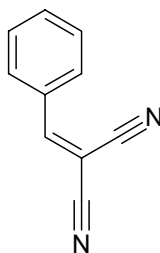
Schmp.: 236-237 °C; IR (KBr): 3409 cm^{-1} , 3323 cm^{-1} und 3231 cm^{-1} (NH), 2217 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1697 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 5.02 (s, 2 H, CH_2), 7.41 (dd, 1 H, J = 5.0/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.79 (dd, 1 H, J = 5.0/3.0 Hz, Thiophen-H), 7.90 (br s, 2 H, NH_2 , überlagert mit dd bei 7.79, d bei 7.96 und dd bei 8.08), 7.96 (d, 2 H, J = 8.1 Hz, Teil eines $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems, ArH), 8.08 (dd, 1 H, J = 3.0/1.3 Hz, Thiophen-H), 8.27 (d, 2 H, J = 8.1 Hz, Teil eines $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 38.1 (CH_2); 125.7 (q, 2 C, $^3J_{\text{C},\text{F}}$ = 3.6 Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 127.4, 127.6, 128.8, 129.2 (2 C) (tert. C); 85.5, 92.8, 115.2, 115.4, 123.7 (q, $^1J_{\text{C},\text{F}}$ = 273 Hz, $\text{C-C-}\underline{\text{C}}\text{F}_3$), 132.7 (q, $^2J_{\text{C},\text{F}}$ = 31.8 Hz, $\text{C-}\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 133.3, 138.8, 152.9, 159.5, 165.7, 192.1 (quart. C); $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_4\text{OS}_2$ (444.46); ber. C 54.05, H 2.49, N 12.61; gef. C 53.94, H 2.37, N 12.43; HPLC: 99.9 bei 254 nm und 99.9 bei 280 nm, t_{N} = 5.37, t_{M} = 1.01 min (ACN/ H_2O ; 55:45), λ_{max} : 244 nm, 280 nm, 346 nm.

2-Amino-6-{[2-(3-chlorphenyl)-2-oxoethyl]sulfanyl}-4-(3-thienyl)pyridin-3,5-dicarbonitril
(55k)



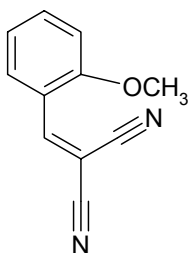
Nach AAV 7 aus 6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**) (103 mg, 0.400 mmol), Kaliumhydroxid-Lösung (10%) (224 µl, 0.400 mmol) und 2-Brom-1-(3-chlorphenyl)ethanon (93.4 mg, 0.400 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 99.1 mg (60%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 224-225 °C; IR (KBr): 3471 cm⁻¹ und 3353 cm⁻¹ (NH), 2210 cm⁻¹ (C≡N), 1685 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 4.99 (s, 2 H, CH₂), 7.41 (dd, 1 H, *J* = 5.1/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.63 („t“, 1 H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 7.77-7.79 (m, 1 H, ArH), 7.79 (dd, 1 H, *J* = 5.1/3.0 Hz, Thiophen-H, überlagert mit m bei 7.77-7.79), 7.93 (br s, 2 H, NH₂, Überlagerung mit Signalen der aromatischen Protonen), 8.02-8.04 (m, 1 H, ArH), 8.08 („t“, 1 H, *J* = 1.7 Hz, ArH), 8.09 (dd, 1 H, *J* = 3.0/1.3 Hz, Thiophen-H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 38.0 (CH₂); 127.0, 127.4, 127.7, 128.0, 128.8, 130.7, 133.3 (tert. C); 85.4, 92.8, 115.3, 115.5, 133.3, 133.6, 137.3, 152.9, 159.5, 165.8, 191.6 (quart. C); C₁₉H₁₁ClN₄OS₂ (410.90); ber. C 55.54, H 2.70, N 13.64, S 15.61; gef. C 55.62, H 2.83, N 13.74, S 15.35; HPLC: 99.7 bei 254 nm und 99.7 bei 280 nm, *t*_N = 4.48, *t*_M = 1.01 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max}: 250 nm, 281 nm, 346 nm.

2-Benzylidenmalonsäuredinitril (**58a**)

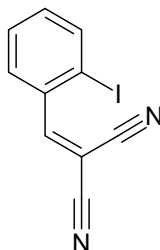
Nach AAV 1 aus Benzaldehyd (1.01 μ l, 10.0 mmol) und Malonsäuredinitril (687 mg, 10.4 mmol). Man erhält 1.02 g (66%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 83-84 °C (Lit.¹⁷³: 83.5-84.0 °C).

2-(2-Methoxybenzyliden)malonsäuredinitril (**58b**)

Nach AAV 1 aus 2-Methoxybenzaldehyd (681 mg, 5.00 mmol) und Malonsäuredinitril (344 mg, 5.20 mmol). Man erhält 740 mg (80%) gelbe Kristalle.

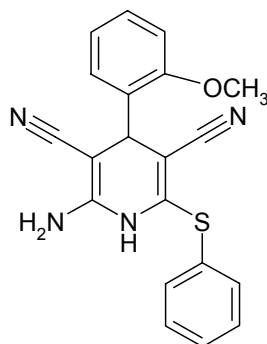
Schmp.: 82-83 °C (Lit.¹⁷³: 84.0-84.5 °C).

2-(2-Iodbenzyliden)malonsäuredinitril (**58c**)

Nach AAV 1 aus 2-Iodbenzaldehyd (464 mg, 2.00 mmol) und Malonsäuredinitril (137 mg, 2.08 mmol). Man erhält 324 mg (58%) eines braunen Pulvers.

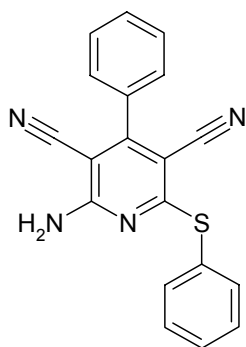
Schmp.: 94-98 °C; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ (ppm) = 7.36 („dt“, 1 H, J = 7.8/1.5 Hz, ArH), 7.61-7.65 (m, 1 H, ArH), 7.89 (dd, 1 H, J = 7.8/1.5 Hz, ArH), 8.10 (dd, 1 H, J = 7.8/1.0 Hz, ArH), 8.47 (s, 1 H, CH olefinisch); $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{IN}_2$ (280.07).

2-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-6-(phenylsulfanyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**60b**)



Nach AAV 3, Methode a, aus 2-(2-Methoxybenzyliden)malonsäuredinitril (**58b**) (368 mg, 2.00 mmol), Malonsäuredinitril (132 mg, 2.00 mmol) und Thiophenol (204 μl , 2.00 mmol). Nach Abtrennung von **61b** über Säulenchromatographie (Trennstrecke 20 cm, Elutionsmittel: Toluol/Ethylacetat 50:50) erhält man 45.9 mg (6%) eines weißen Pulvers.

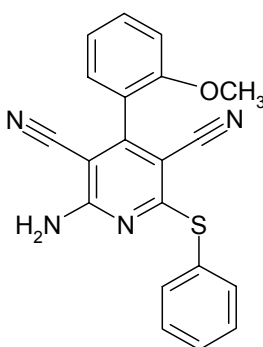
Schmp.: 237-239 °C; IR (KBr): 3462 cm^{-1} , 3345 cm^{-1} , 3270 cm^{-1} und 3204 cm^{-1} (NH), 3091 cm^{-1} (CH aromatisch), 2967 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2207 cm^{-1} und 2173 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ (ppm) = 3.77 (s, 3 H, OCH_3), 4.73 (s, 1 H, CH), 5.84 (s, 2 H, NH_2 , Signal wird bei D_2O -Zugabe gelöscht), 6.98 („dt“, 1 H, J = 7.6/1.0 Hz, ArH), 7.04 (d, 1 H, J = 7.3 Hz, ArH), 7.14 (dd, 1 H, J = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.26-7.30 (m, 1 H, ArH), 7.35-7.47 (m, 5 H, ArH), 9.17 (s, 1 H, NH, Signal wird bei D_2O -Zugabe gelöscht); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100.6 MHz): δ (ppm) = 36.1 (CH); 55.5 (OCH_3); 111.4, 120.7, 128.0, 128.7, 128.8, 129.2 (2 C), 129.8 (2 C) (tert. C); 54.7, 92.3, 118.1, 120.5, 130.9, 131.5, 140.5, 150.9, 156.3 (quart. C); $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}$ (360.43); ber. C 66.65, H 4.47, N 15.54, S 8.90; gef. C 67.55, H 4.77, N 15.25, S 8.36; HPLC: 97.7% bei 254 nm und 97.3% bei 280 nm, t_{N} = 2.44 min, t_{M} = 1.03 min (ACN/ H_2O ; 50:50), λ_{max} : 236 nm, 274 nm und 349 nm.

2-Amino-4-phenyl-6-(phenylsulfanyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (**61a**)

Nach AAV 3 Methode a aus 2-Benzylidenmalonsäuredinitril (**58a**) (1.54 g, 10.0 mmol), Malonsäuredinitril (660 mg, 10.0 mmol) und Thiophenol (1.02 ml, 10.0 mmol) mit 50 μ l Triethylamin in 10.0 ml Ethanol. Man erhält 1.03 g (31%; Ausbeute bezogen auf Benzaldehyd: 21%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 227-229 °C (Lit.⁹⁶: 223-224 °C); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 7.47-7.52 (m, 3 H, ArH), 7.54-7.64 (m, 7 H, ArH), 7.80 (br s, 2 H, NH₂); C₁₉H₁₂N₄S (328.39).

Nach AAV 3 Methode b aus Benzaldehyd (101 μ l, 1.00 mmol), Malonsäuredinitril (138 mg, 2.08 mmol) und Thiophenol (166 μ l, 1.07 mmol) mit 14 μ l Triethylamin in 3.3 ml Ethanol. Man erhält 90.0 mg (27%) eines gelben Pulvers. Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten sind identisch mit den Daten, die durch Methode a erhalten wurden.

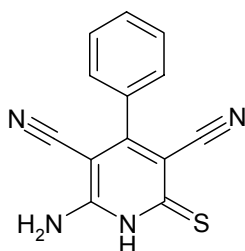
2-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-6-(phenylsulfanyl)pyridin-3,5-dicarbonitril (**61b**)

Nach AAV 3 Methode a aus 2-(2-Methoxybenzyliden)malonsäuredinitril (**58b**) (368 mg, 2.00 mmol), Malonsäuredinitril (132 mg, 2.00 mmol) und Thiophenol (204 μ l, 2.00 mmol). Nach Abtrennung von **60b** über Säulenchromatographie (Trennstrecke 20 cm,

Elutionsmittel Toluol/Ethylacetat 50:50) erhält man 96.8 mg (14%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 226-227 °C; IR (KBr): 3473 cm⁻¹, 3337 cm⁻¹ und 3216 cm⁻¹ (NH), 3073 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2997 cm⁻¹, 2964 cm⁻¹ und 2931 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2219 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.83 (s, 3 H, OCH₃), 7.12 („dt“, 1 H, *J* = 7.6/1.0 Hz, ArH), 7.14 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.36 (dd, 1 H, *J* = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.49-7.57 (m, 4 H, ArH), 7.61-7.63 (m, 2 H, ArH), 7.76 (br s, 2 H, NH₂); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.6 (OCH₃); 111.9, 120.6, 129.4 (2 C), 129.7, 129.7, 132.0, 134.8 (2 C) (tert. C); 68.0, 94.1, 114.7, 115.0, 122.5, 126.9, 155.7, 156.4, 159.4, 165.5 (quart. C); C₂₀H₁₄N₄OS (358.42); ber. C 67.02, H 3.94, N 15.63, S 8.95; gef. C 67.44, H 4.14, N 15.95, S 8.68; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, *t*_N = 6.21 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max}: 248, 293 und 344 nm.

6-Amino-4-phenyl-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62a**)



Methode a: Nach AAV 4 aus Benzaldehyd (101 µl, 1.00 mmol), Malonsäuredinitril (67.1 mg, 1.02 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (100 mg, 1.00 mmol). Man erhält 81.7 mg (32%) eines gelben Pulvers.

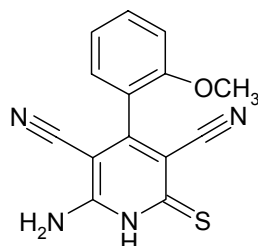
Methode b: Eine Lösung von **61a** (98.5 mg, 3.00 mmol) in 10.0 ml DMF wird mit Natriumsulfid (780 mg, 10.0 mmol) bei 80 °C gerührt. Nach 2 h wird abgekühlt und 20.0 ml einmolare Salzsäure hinzugegeben. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und aus Eisessig umkristallisiert. Man erhält 440 mg (58%) eines gelben Pulvers.

Die ¹H-NMR-Daten von **62a**, hergestellt durch Methode b, waren identisch mit denen von **62a**, das durch Methode a erhalten wurde.

Schmp.: 235-240 °C (Lit.¹⁰²: 234 °C); IR (KBr): 3382 cm⁻¹, 3289 cm⁻¹ und 3207 cm⁻¹ (NH), 2231 cm⁻¹ und 2214 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 7.49-7.53 (m, 2

H, ArH), 7.54-7.57 (m, 3 H, ArH), 7.95 (br s, 2 H, NH₂), 13.02 (s, 1 H, NH); C₁₃H₈N₄S (252.30).

6-Amino-4-(2-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62b**)

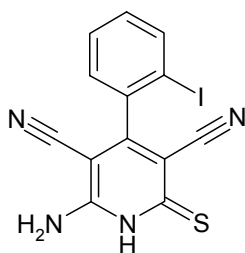


Methode a: Nach AAV 4 aus 2-Methoxybenzaldehyd (136 mg, 0.999 mmol), Malonsäuredinitril (67.4 mg, 1.02 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (106 mg, 1.06 mmol). Man erhält 157 mg (56%) eines gelben Pulvers.

Methode b: Eine Lösung von **61b** (717 mg, 2.00 mmol) in 7.0 ml DMF wird mit Natriumsulfid (520 mg, 6.70 mmol) bei 80 °C gerührt. Nach 2 h wird abgekühlt und 13.3 ml einmolare Salzsäure hinzugegeben. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und in Toluol/Ethylacetat 3:1 aufgekocht. Man erhält 84.8 mg (15%) eines gelben Pulvers.

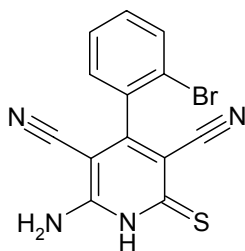
Die ¹H-NMR-Daten von **62b**, hergestellt durch Methode b, waren identisch mit denen von **62b**, das durch Methode a erhalten wurde.

Schmp.: 227-232 °C (Lit.¹⁰⁸: 238-240 °C); IR (KBr): 3382 cm⁻¹, 3289 cm⁻¹ und 3207 cm⁻¹ (NH), 2231 cm⁻¹ und 2214 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.82 (s, 3 H, OCH₃), 7.10 („dt“, 1 H, *J* = 7.6/0.8 Hz, ArH), 7.21 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 7.31 (dd, 1 H, *J* = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.52 (ddd, 1 H, *J* = 7.6/1.8/1.0 Hz, ArH), 7.90 (br s, 2 H, NH₂), 13.01 (br s, 1 H, NH); C₁₄H₁₀N₄OS (282.32).

6-Amino-4-(2-iodophenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62c**)

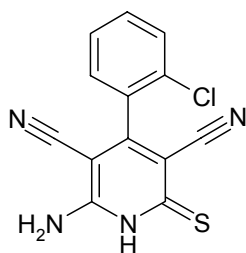
Nach AAV 4 aus 2-Iodbenzaldehyd (119 mg, 0.513 mmol), Malonsäuredinitril (35.3 mg, 0.534 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (52.3 mg, 0.522 mmol). Man erhält 110 mg (57%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 215-216 °C (Lit.¹⁰³: 216-218 °C).

6-Amino-4-(2-bromphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62d**)

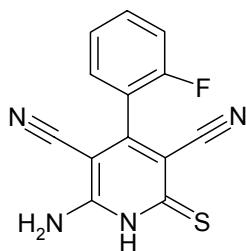
Nach AAV 4 aus 2-Brombenzaldehyd (351 µl, 3.00 mmol), Malonsäuredinitril (198 mg, 3.00 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (301 mg, 3.00 mmol). Man erhält 603 mg (61%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 208-212 °C; IR (KBr): 3389 cm⁻¹, 3314 cm⁻¹ und 3198 cm⁻¹ (NH), 2220 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 7.47-7.50 (m, 2 H, ArH), 7.57-7.59 (m, 1 H, ArH), 7.82-7.83 (m, 1 H, ArH), 6.53-9.57 (br s, 2 H, NH₂, Überlagerung mit voran genannten Signalen), 13.18 (s, 1 H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 128.3, 129.4, 131.8, 132.8 (tert. C); 81.7, 103.0, 113.7, 115.6, 120.1, 135.4, 154.2, 157.8, 179.3 (quart. C); C₁₃H₇BrN₄S (331.19); ber. C 47.14, H 2.13, N 16.92, S 9.68; gef. C 47.17, H 2.39, N 16.94, S 9.05.

6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62e**)

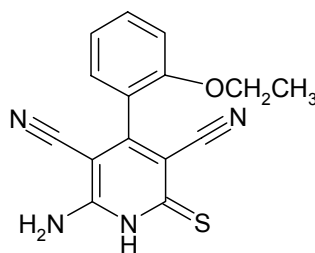
Nach AAV 4 aus 2-Chlorbenzaldehyd (113 μ l, 1.00 mmol), Malonsäuredinitril (67.5 mg, 1.02 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (129.9 mg, 1.30 mmol). Man erhält 165 mg (57%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 177-180 °C (Lit.¹⁰³: 180-182 °C).

6-Amino-4-(2-fluorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62f**)

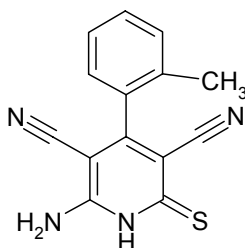
Nach AAV 4 aus 2-Fluorbenzaldehyd (105 μ l, 1.00 mmol), Malonsäuredinitril (68.8 mg, 1.04 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (105 mg, 1.04 mmol). Man erhält 133 mg (49%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 184-185 °C; IR (KBr): 3380 cm^{-1} , 3311 cm^{-1} und 3201 cm^{-1} (NH), 2228 cm^{-1} (Doppelpeak, $\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 7.37-7.47 (m, 2 H, ArH), 7.54 („dt“, 1 H, J = 7.5/1.9 Hz, ArH), 7.59-7.67 (m, 1 H, ArH), 7.99 (br s, 2 H, NH_2), 13.04 (br s, 1 H, NH); $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{FN}_4\text{S}$ (270.29).

6-Amino-4-(2-ethoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62g**)

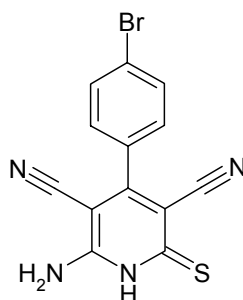
Nach AAV 4 aus 2-Ethoxybenzaldehyd (140 μ l, 1.00 mmol), Malonsäuredinitril (67.7 mg, 1.02 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (103 mg, 1.02 mmol). Man erhält 127 mg (43%) eines gelben Pulvers.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 1.29 (t, 3 H, J = 7.1 Hz, CH_3), 4.08-4.15 (m, 2 H, CH_2), 7.08 („dt“, 1 H, J = 7.6/1.0 Hz, ArH), 7.19 (d, 1 H, J = 7.8 Hz, ArH), 7.31 (dd, 1 H, J = 7.6/1.8 Hz, ArH), 7.49 (ddd, 1 H, J = 7.6/1.8/1.0 Hz, ArH), 7.89 (br s, 2 H, NH_2), 13.01 (br s, 1 H, NH); $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}$ (296.35).

6-Amino-4-(2-methylphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62h**)

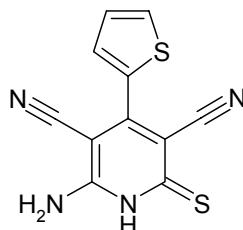
Nach AAV 4 aus 2-Methylbenzaldehyd (116 μ l, 1.00 mmol), Malonsäuredinitril (67.0 mg, 1.01 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (101 mg, 1.00 mmol). Man erhält 134 mg (50%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 170-173 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr): 3313 cm^{-1} und 3203 cm^{-1} (NH), 2216 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 2.22 (s, 3 H, CH_3), 7.22-7.26 (m, 1 H, ArH), 7.32-7.36 (m, 1 H, ArH), 7.37-7.44 (m, 2 H, ArH), 7.97 (br s, 2 H, NH_2), 13.04 (br s, 1 H, NH); $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S}$ (266.32); ber. C 63.14, H 3.78, N 21.04, S 12.04; gef. C 63.32, H 4.05, N 21.32, S 11.46; HPLC: 92.0% bei 254 nm und 89.6% bei 280 nm, t_N = 3.79 min, t_M = 1.03 min (ACN/ H_2O +(Et_3N) $_2\text{SO}_4$; 30:70), λ_{max} : 239 nm, 385 nm, 318 nm.

6-Amino-4-(4-bromphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62i**)

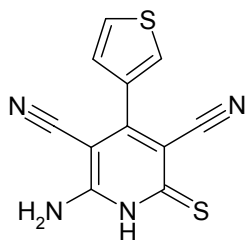
Nach AAV 4 aus 4-Brombenzaldehyd (556 mg, 3.01 mmol), Malonsäuredinitril (200 mg, 3.02 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (301 mg, 3.01 mmol). Nach Absaugen wird nochmals in Essigsäure (ca. 2 ml) aufgekocht. Man erhält 580 mg (58%) eines orangegelben Pulvers.

Schmp.: 279-283 °C (Lit.¹⁷⁴: 280-282 °C).

6-Amino-4-(2-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62j**)

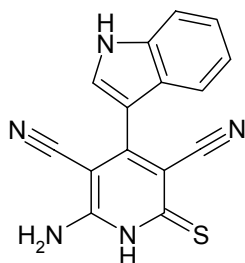
Nach AAV 4 aus Thiophen-2-carbaldehyd (280 µl, 3.00 mmol), Malonsäuredinitril (200 mg, 3.02 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (300 mg, 3.00 mmol). Man erhält 456 mg (59%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: ab 180 °C Dunkelfärbung, 215 °C schwarze Schmelze (Lit.¹⁷⁵: 242 °C); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 7.26 (dd, 1 H, *J* = 5.1/3.8 Hz, Thiophen-H), 7.54 (dd, 1 H, *J* = 3.8/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.63-8.35 (br s, 2 H, NH₂), 7.94 (dd, 1 H, *J* = 5.1/1.3 Hz, Thiophen-H, Überlagerung mit br s bei 7.63-8.35 ppm), 13.01 (br s, 1 H, NH); C₁₁H₆N₄S₂ (258.32). Die ¹H-NMR-Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.¹⁷⁵

6-Amino-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62k**)

Nach AAV 4 aus Thiophen-3-carbaldehyd (438 μ l, 5.00 mmol), Malonsäuredinitril (330 mg, 5.00 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (501 mg, 5.00 mmol). Man erhält 613 mg (47%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 234-238 °C; IR (KBr): 3477 cm^{-1} , 3384 cm^{-1} und 3324 cm^{-1} (NH), 2214 cm^{-1} und 2201 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ (ppm) = $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz): δ (ppm) = 7.34 (dd, 1 H, J = 5.1/1.3 Hz, Thiophen-H), 7.45-7.93 (br s, 2 H, NH_2), 7.74 (dd, 1 H, J = 5.1/2.8 Hz, Thiophen-H, Überlagerung mit br s bei 7.45-7.93), 8.00 (dd, 1 H, J = 2.8/1.3 Hz, Thiophen-H), 12.87 (br s, 1 H, NH); $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{N}_4\text{S}_2$ (258.32).

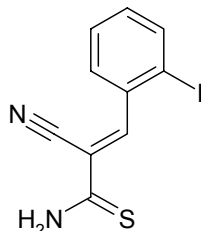
6-Amino-4-(1H-indol-3-yl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**62l**)

Nach AAV 4 aus Indol-2-carbaldehyd (146 mg, 1.00 mmol), Malonsäuredinitril (66.1 mg, 1.00 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (101 mg, 1.01 mmol). Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie (25 cm Trennstrecke, Elutionsmittel: Petrolether/Ethylacetat 70:30, später schrittweise bis zum reinen Ethylacetat) erhält man 62.0 mg (21%) eines gelben Pulvers.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ (ppm) = 7.15 („t“, 1 H, J = 7.1 Hz, ArH), 7.22 („t“, 1 H, J = 7.1 Hz, ArH), 7.48-7.53 (m, 2 H, ArH), 7.76 (br s, 2 H, NH_2 , Signallöschung mit D_2O), 7.89 (d, 1 H, J = 2.0 Hz, ArH, s mit D_2O , Überlagerung mit br s bei 7.76 ppm), 11.92 (s, 1 H, Indol-NH), 12.84 (br s, 1 H, Pyridin-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100.6 MHz): δ (ppm) =

113.0, 120.7, 121.0, 123.2, 128.8 (tert. C); 81.9, 102.7, 109.0, 115.9, 118.2, 125.0, 136.5, 153.7, 179.8, 190.1 (quart. C); C₁₅H₉N₅S (291.33).

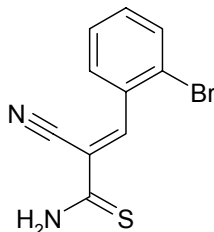
2-Cyan-3-(2-iodphenyl)-2-propenthioamid (**63c**)



Nach AAV 2 aus 2-Iodbenzaldehyd (232 mg, 1.00 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (100 mg, 1.00 mmol). Man erhält 248 mg (79%) orangefarbene Kristalle.

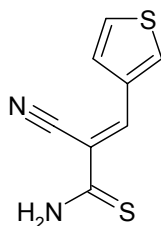
Schmp.: 173-174 °C; IR (KBr): 3333 cm⁻¹, 3297 cm⁻¹ und 3179 cm⁻¹ (NH), 2229 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 7.29 („dt“, 1 H, *J* = 7.8/1.5 Hz, ArH), 7.59 („dt“, 1 H, *J* = 7.8/1.0 Hz, ArH), 7.84 (dd, 1 H, *J* = 7.8/1.5 Hz, ArH), 8.06 (dd, 1 H, *J* = 8.1/1.0 Hz, ArH), 8.14 (s, 1 H, CH), 9.70 (br s, 1 H, NH), 10.25 (br s, 1 H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 128.7, 129.6, 132.7, 139.4, 151.2 (tert. C); 101.3, 115.2, 115.7, 136.1, 191.0 (quart. C); C₁₀H₇IN₂S (314.15); ber. C 38.23, H 2.25, N 8.92, S 10.21; gef. C 38.60, H 2.26, N 10.13, S 9.71; HPLC: 95.1% bei 254 nm und 95.4% bei 280 nm, *t*_N = 2.73 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max}: 222 nm, 242 nm, 301 nm.

3-(2-Bromphenyl)-2-cyan-2-propenthioamid (**63d**)



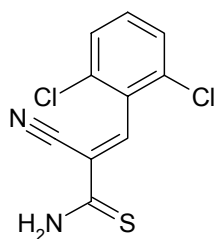
Nach AAV 2 aus 2-Brombenzaldehyd (117 µl, 1.00 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (100 mg, 1.00 mmol). Man erhält 194 mg (73%) orangefarbene Kristalle.

Schmp.: 175-176 °C (Lit.¹⁰⁷: 170 °C).

2-Cyan-3-(3-thienyl)-2-propenthioamid (**63k**)

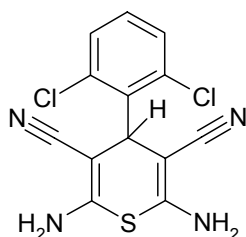
Nach AAV 2 aus Thiophen-3-carbaldehyd (87.7 μ l, 1.00 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (100 mg, 1.00 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 114 mg (59%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 151-155 °C (Lit.¹⁰⁹: 151 °C); IR (KBr): 3361 cm^{-1} , 3263 cm^{-1} und 3139 cm^{-1} (NH), 3054 cm^{-1} (CH aromatisch), 2207 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 7.80 (d, 2 H, J = 2.0 Hz, Thiophen-H), 8.15 (s, 1 H, CH), 8.40 („t“, 1 H, J = 2.0 Hz, Thiophen-H), 9.51 (s, 1 H, NH), 10.03 (s, 1 H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 131.8, 134.1, 141.0, 146.3 (tert. C); 115.3, 122.0, 139.5, 197.5 (quart. C); $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_2$ (194.28); ber. C 49.46, H 3.11, N 14.42, S 33.01; gef. C 49.56, H 3.01, N 14.25, S 34.30.

3-(2,6-Dichlorphenyl)-2-cyan-2-propenthioamid (**63m**)

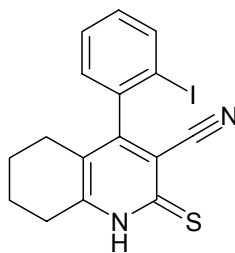
Nach AAV 2 aus 2,6-Dichlorbenzaldehyd (175 mg, 1.00 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (103 mg, 1.03 mmol). Man erhält 130 mg (50%) orangefarbene Kristalle.

Schmp.: 121-122 °C (Lit.¹⁰⁷: 123 °C).

2,6-Diamino-4-(2,6-dichlorphenyl)-4H-thiopyran-3,5-dicarbonitril (**69**)

Nach AAV 4 aus 2,6-Dichlorbenzaldehyd (87.5 mg, 0.500 mmol), Malonsäuredinitril (36.5 mg, 0.552 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (53.9 mg, 0.538 mmol). Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie (30 cm Trennstrecke, Elutionsmittel: Ethylacetat) erhält man 64.9 mg (40%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 155-158 °C; IR (KBr): 3440 cm^{-1} , 3321 cm^{-1} und 3201 cm^{-1} (NH), 2194 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 5.44 (s, 1 H, CH), 6.92 (br s, 4 H, 2x NH_2 , Signallöschung bei D_2O -Zugabe), 7.36 (t, 1 H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.51 (d, 2 H, $J = 8.1$ Hz, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 38.9 (CH), 129.8 (3 tert. C); 67.0 (2 C), 117.7 (2 C), 135.1 (2 C), 135.3, 151.2 (2 C) (quart. C); $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_4\text{S}$ (323.20); ber. C 48.31, H 2.49, N 17.34, S 9.92; gef. C 48.72, H 2.46, N 17.91, S 9.86.

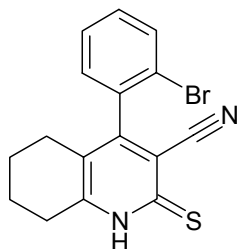
4-(2-Iodphenyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72c**)

Nach AAV 5 aus 2-Cyan-3-(2-iodphenyl)-2-propenthioamid (**63c**) (126 mg, 0.400 mmol) und Cyclohexanon (41.5 μl , 0.400 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 67.7 mg (43%) eines braunen Pulvers.

Schmp.: 234-238 °C; IR (KBr): 3225 cm^{-1} (NH), 2925 cm^{-1} und 2861 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2231 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.55-1.66 (m, 2 H, CH_2), 1.68-1.72 (m, 2 H, CH_2), 1.90-1.99 (m, 2 H, CH_2), 2.75-2.85 (m, 2 H, CH_2), 7.25 („dt“, 1 H, $J = 7.9/1.7$ Hz, ArH), 7.31 (dd, 1 H, $J = 7.5/1.5$ Hz, ArH), 7.58 („dt“, 1 H, $J = 7.5/1.1$ Hz, ArH), 8.02 (dd, 1 H, $J = 7.9/1.0$ Hz, ArH), 14.14 (br s, 1 H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9

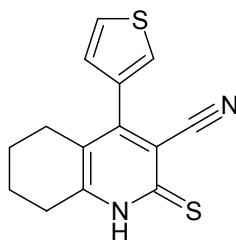
MHz): δ (ppm) = 20.3, 21.0, 24.8, 27.0 (sek. C); 128.0, 128.9, 130.7, 138.9 (tert. C); 96.3, 113.9, 115.6, 120.1, 140.0, 152.9, 159.0, 175.4 (quart. C); $C_{16}H_{13}IN_2S$ (392.26); ber. C 48.99, H 3.34, N 7.14, S 8.17; gef. C 48.38, H 3.46, N 7.42, S 8.51; HPLC: 96.8% bei 254 nm und 96.6% bei 280 nm, t_N = 3.44 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 45:55), λ_{max} : 307 nm.

4-(2-Bromphenyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72d**)



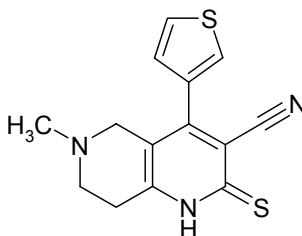
Nach AAV 5 aus 3-(2-Bromphenyl)-2-cyan-2-propenthioamid (**63d**) (80.1 mg, 0.300 mmol) und Cyclohexanon (31.1 μ l, 0.300 mmol). Reaktionsdauer: 4 h. Man erhält 38.1 mg (37%) eines gelben Pulvers, welches ohne weitere Reinigung für nachfolgende Synthesen verwendet wird.

Schmp.: 220-221 °C; IR (KBr): 3391 cm^{-1} (NH), 3053 cm^{-1} (CH aromatisch), 2943 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2223 cm^{-1} (C \equiv N); 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.55-1.65 (m, 2 H, CH₂), 1.68-1.72 (m, 2 H, CH₂), 1.93-2.03 (m, 2 H, CH₂), 2.76-2.85 (m, 2 H, CH₂), 7.38 (dd, 1 H, J = 7.5/1.7 Hz, ArH), 7.46 („dt“, 1 H, J = 7.8/1.7 Hz, ArH), 7.57 („dt“, 1 H, J = 7.5/1.1 Hz, ArH), 7.83 (dd, 1 H, J = 8.1/1.0 Hz, ArH), 14.17 (br s, 1 H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.3, 20.9, 24.6, 27.0 (sek. C); 128.4, 129.0, 131.2, 132.7 (tert. C); 113.9, 115.6, 120.1, 120.3, 135.8, 153.0, 156.4, 175.2 (quart. C); $C_{16}H_{13}BrN_2S$ (345.26); HPLC: 96.3% bei 254 nm und 95.1% bei 280 nm, t_N = 2.35 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max} : 308 nm.

4-(3-Thienyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**72k**)

Nach AAV 5 aus 2-Cyan-3-(3-thienyl)-2-propenthioamid (**63k**) (194 mg, 1.00 mmol) und Cyclohexanon (104 μ l, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 5 h. Man erhält 125 mg (46%) eines gelben Pulvers, welches ohne weitere Reinigung für nachfolgende Synthesen verwendet wird.

Schmp.: 258-259 °C; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ (ppm) = 1.56-1.73 (m, 4 H, 2x CH_2), 2.20 (t, 2 H, $J = 6.3$ Hz, CH_2), 2.77 (t, 2 H, $J = 6.3$ Hz, CH_2), 7.21 (dd, 1 H, $J = 5.1/1.3$ Hz, Thiophen-H), 7.74 (dd, 1 H, $J = 5.1/3.0$ Hz, Thiophen-H), 7.80 (dd, 1 H, $J = 3.0/1.3$ Hz, Thiophen-H), 13.91 (br s, 1 H, NH); $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2$ (272.39).

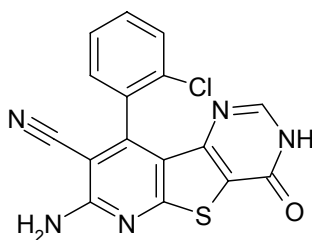
6-Methyl-4-(3-thienyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydro[1,6]naphthyridin-3-carbonitril (**73k**)

2-Cyan-3-(3-thienyl)-2-propenthioamid (**63k**) (194 mg, 1.00 mmol) und 1-Methyl-4-piperidon (116 μ l, 1.00 mmol) werden in absolutem Ethanol (3 ml) suspendiert. Nach Zugabe einer katalytischen Menge an Piperidin wird das Gemisch für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird der Niederschlag abgesaugt, mit etwas Petrolether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Man erhält 52.1 mg (18%) eines gelben Pulvers, das ohne weitere Reinigung für die Synthese von **53** verwendet wird.

Schmp.: Schwarzfärbung ab 235 °C, 245-247 °C schwarze Schmelze; IR (KBr): 3429 cm^{-1} (NH), 3082 cm^{-1} (CH aromatisch), 2916 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2792 cm^{-1} (CH in N- CH_3), 2222 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz): δ (ppm) = 2.24 (s, 3 H, N- CH_3), 2.60 (t, 2 H, $J = 5.7$ Hz, CH_2), 2.85 (t, 2 H, $J = 5.8$ Hz, CH_2), 3.01 (s, 2 H, CH_2), 7.24 (dd, 1 H, $J = 4.9/1.3$ Hz, Thiophen-H), 7.77 (dd, 1 H, $J = 4.9/3.0$ Hz, Thiophen-H), 7.86 (dd, 1 H, $J =$

2.8/1.3 Hz, Thiophen-H), 14.06 (br s, 1 H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 27.4, 49.5, 53.4 (CH_2); 44.9 (N- CH_3); 127.0, 127.4, 127.4 (tert. C); 113.6, 116.4, 118.7, 133.3, 150.0, 151.1, 175.8 (quart. C); $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{S}_2$ (287.41); ber. C 58.51, H 4.56, N 14.62, S 22.31; gef. C 58.03, H 4.66, N 14.54, S 22.22.

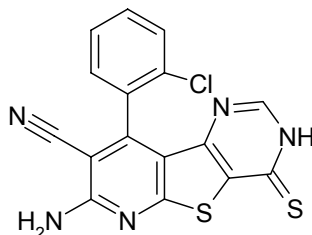
7-Amino-9-(2-chlorphenyl)-4-oxo-3,4-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-d]pyrimidin-8-carbonitril (77)



Eine Suspension von 3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44d**) (97.7 mg, 0.300 mmol) in Ameisensäure wird 5 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Erkalten des Reaktionsgemisches wird das Produkt abgesaugt. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 34.8 mg (33%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 377-378 °C; IR (KBr): 3464 cm^{-1} , 3332 cm^{-1} und 3209 cm^{-1} (NH), 2217 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1657 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 7.47-7.50 (m, 2 H, ArH), 7.54-7.57 (m, 1 H, ArH), 7.62-7.64 (m, 1 H, ArH), 7.75 (br s, 2 H, NH_2), 7.96 (s, 1 H, Pyrimidin-CH), 12.75 (s, 1 H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 125.9, 127.9, 129.1, 129.7, 146.3 (tert. C); 90.4, 113.9, 115.0, 116.8, 130.4, 132.4, 149.6, 150.6, 155.6, 157.9, 164.9 (quart. C); $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{ClN}_5\text{OS}$ (353.79); ber. C 54.32, H 2.28, N 19.80, S 9.06; gef. C 54.12, H 2.41, N 19.52, S 8.82; HPLC: 98.1% bei 254 nm und 98.7% bei 280 nm, t_N = 5.06 min, t_M = 1.03 min (ACN/ H_2O ; 30:70), λ_{max} : 236 nm, 281 nm, 356 nm.

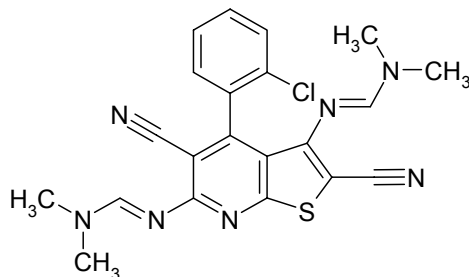
7-Amino-9-(2-chlorophenyl)-4-thioxo-3,4-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-d]pyrimidin-8-carbonitril (**78**)



7-Amino-9-(2-chlorophenyl)-4-oxo-3,4-dihydropyrido[3',2':4,5]-thieno[3,2-d]pyrimidin-8-carbonitril (**77**) (24.0 mg, 0.068 mmol) und Lawessons Reagenz (27.5 mg, 0.068 mmol) werden in Dioxan (0.23 ml) suspendiert und 30 min. zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Reaktionsansatz im Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand mit Ethylacetat verrieben. Der Feststoff wird abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 11.5 mg (46%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 305 °C beginnende Zersetzung, 319 °C schwarze Schmelze; IR (KBr): 3421 cm⁻¹, 3315 cm⁻¹ und 3211 cm⁻¹ (NH), 2223 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 7.49-7.53 (m, 2 H, ArH), 7.55-7.58 (m, 1 H, ArH), 7.64-7.65 (m, 1 H, ArH), 7.97 (br s, 2 H, NH₂, Signallöschung bei D₂O-Zugabe), 8.16 (d, 1 H, *J* = 3.6 Hz, Pyrimidin-CH, s bei D₂O-Zusatz (Kopplung mit br s bei 14.22)), 14.22 (s, 1 H, NH, mit D₂O gelöscht); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 127.2, 129.1, 130.2, 131.0, 146.9 (tert. C); 91.8, 114.8, 115.8, 131.4, 132.3, 133.2, 147.2, 151.7, 159.3, 167.4, 174.5 (quart. C); C₁₆H₈ClN₅S₂ (369.85); ber. C 51.96, H 2.18, N 18.94, S 17.34; gef. C 52.29, H 2.26, N 19.19, S 16.91; HPLC: 98.5% bei 254 nm und 98.3% bei 280 nm, *t*_N = 2.25 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max}: 244 nm, 313 nm, 382 nm.

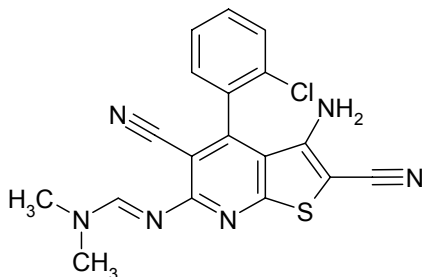
N',N'-(4-(2-Chlorphenyl)-2,5-dicyanthieno[2,3-*b*]pyridin-3,6-diyl)bis(*N,N*-dimethylformimidamid) (**80a**)



3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44d**) (81.3 mg, 0.250 mmol) wird in Dimethylformamid-Dimethylacetal (1.0 ml) suspendiert. Das Gemisch wird 2 h bei 80 °C gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Petrolether gewaschen und mit Ethylacetat (4 ml) und Kieselgel (1.5 g) versetzt. Aus dem Gemisch wird das Lösungsmittel durch Eindampfen am Rotationsverdampfer entfernt. Das Kieselgel mit dem adsorbiertem Feststoff wird auf eine Kieselgelsäule (25 cm Trennstrecke) gegeben (Elutionsmittel: Petrolether/ Ethylacetat 50:50 mit 1% Ameisensäure). Nachdem ein Nebenprodukt die Säule verlassen hat, werden die Fraktionen des gewünschten Produktes aufgefangen. Nach Eindampfen der entsprechenden Fraktionen im Vakuum erhält man einen Film, aus dem bei Zugabe von Wasser ein Niederschlag entsteht. Nach Absaugen erhält man 44.5 mg (41%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 222-223 °C; IR (KBr): 2917 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2226 cm⁻¹ und 2205 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.23 (s, 3 H, CH₃), 2.88 (s, 3 H, CH₃), 3.13 (s, 3 H, CH₃), 3.24 (s, 3 H, CH₃), 7.39 (dd, 1 H, *J* = 7.5/1.6 Hz, ArH), 7.44 („dt“, 1 H, *J* = 7.1/1.6 Hz, ArH), 7.49-7.55 (m, 2 H, ArH), 7.69 (s, 1 H, Amidin-CH), 8.80 (s, 1 H, Amidin-CH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.4, 34.0, 38.7, 40.0 (CH₃); 125.9, 127.8, 129.5, 129.6, 153.0, 156.4 (tert. C); 81.5, 100.7, 114.9, 115.0, 118.8, 130.7, 133.5, 149.6, 155.7, 161.7, 161.9 (quart. C); C₂₁H₁₈ClN₇S (435.93); ber. C 57.86, H 4.16, N 22.49, S 7.36; gef. C 58.26, H 4.20, N 23.52, S 7.33; HPLC: 96.8% bei 254 nm und 95.8% bei 280 nm, *t*_N = 4.19 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max}: 328 nm und 364 nm.

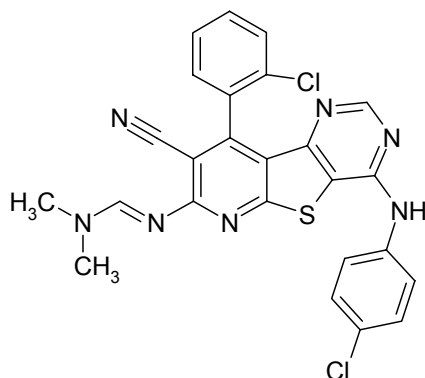
N'-[3-Amino-4-(2-chlorophenyl)-2,5-dicyanthieno[2,3-*b*]pyridin-6-yl]-*N,N*-dimethylformimidamid (**81**)



3,6-Diamino-4-(2-chlorophenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**44d**) (97.7 mg, 0.300 mmol) wird in getrocknetem Xylol (0.9 ml) gelöst und mit Dimethylformamid-Dimethylacetal (40.1 μ l, 0.300 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Erkalten des Reaktionsgemisches wird das Produkt abgesaugt. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 58.2 mg (45%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 329-330 °C; IR (KBr): 3480 cm^{-1} und 3387 cm^{-1} (NH), 2227 cm^{-1} und 2187 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz): δ (ppm) = 3.13 (s, 3 H, CH_3), 3.24 (s, 3 H, CH_3), 5.32 (s, 2 H, NH_2 , Signal wird bei D_2O -Zugabe gelöscht), 7.62-7.70 (m, 3 H, ArH), 7.78-7.80 (m, 1 H, ArH), 8.79 (s, 1 H, CH); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150.9 MHz): δ (ppm) = 34.8, 40.7 (CH_3); 128.2, 130.1, 130.2, 132.3, 157.2 (tert. C); 71.3, 100.9, 114.6, 115.1, 115.4, 131.4, 131.6, 148.9, 149.6, 162.2, 163.3 (quart. C); $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_6\text{S}$ (380.86); ber. C 56.77, H 3.44, N 22.07, S 8.42; gef. C 56.96, H 3.58, N 22.35, S 8.49; HPLC: 98.0% bei 254 nm und 97.0% bei 280 nm, t_N = 2.82 min, t_M = 1.02 min (ACN/ H_2O ; 55:45), λ_{max} : 262 nm, 301 nm, 329 nm.

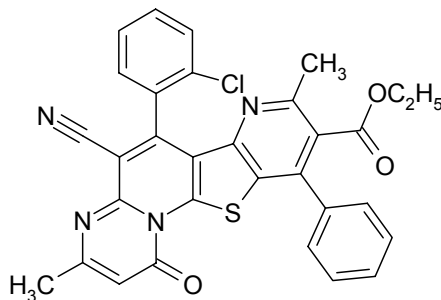
N'-[4-(4-Chloranilino)-9-(2-chlorophenyl)-8-cyanpyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl]-*N,N*-dimethylformimidamid (**85**)



4-Chloranilin (66.3 mg, 0.519 mmol) wird zu einer Lösung von *N'*,*N'*-(4-(2-Chlorphenyl)-2,5-dicyanthieno[2,3-*b*]pyridin-3,6-diyl)bis(*N,N*-dimethylformimidamid) (**80a**) (112 mg, 0.257 mmol) in Eisessig (1.0 ml) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 4 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Erkalten des Reaktionsgemisches wird ein Niederschlag abgesaugt und mit Ethylacetat (4 ml) und Kieselgel (1.5 g) versetzt. Aus dem Gemisch wird das Lösungsmittel durch Eindampfen am Rotationsverdampfer entfernt. Das Kieselgel mit dem adsorbiertem Feststoff wird auf eine Kieselgelsäule (30 cm Trennstrecke) gegeben (Elutionsmittel: Petrolether/Ethylacetat 50:50), dadurch werden die Nebenprodukte abgetrennt. Die Fraktionen, die das Produkt enthalten, werden im Vakuum eingedampft, und man erhält 37.1 mg (28%) eines orangefarbenen Pulvers.

Schmp.: 211-214 °C; IR (KBr): 3389 cm⁻¹ (NH), 2920 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2201 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ (ppm) = 2.38 (s, 3 H, CH₃), 2.98 (s, 3 H, CH₃), 7.14-7.16 (m, 3 H, Teil eines AA'XX'-Systems und NH überlagert, Integral entspricht 2 H bei Zugabe von D₂O), 7.21-7.24 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.49 (dd, 1 H, *J* = 7.6/1.3 Hz, ArH), 7.57 („dt“, 1 H, *J* = 6.8/1.8 Hz, ArH), 7.59 (s, 1 H, Pyrimidin-H), 7.62-7.70 (m, 2 H, ArH), 8.89 (s, 1 H, Amidin-CH); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150.9 MHz): δ (ppm) = 34.1, 40.4 (2x CH₃); 122.4 (2 C), 127.6, 128.9 (2 C), 129.9, 131.0, 131.1, 153.5, 158.5 (tert. C); 88.6, 106.4, 115.6, 124.8, 129.8, 133.9, 135.4, 136.1, 141.9, 155.7, 158.3, 159.1, 166.0 (quart. C); C₂₅H₁₇Cl₂N₇S (518.42); ber. C 57.92, H 3.31, N 18.91, S 6.19; gef. C 58.27, H 3.43, N 19.10, S 6.04; HPLC: 97.5% bei 254 nm und 97.5% bei 280 nm, *t*_N = 2.63 min, *t*_M = 1.04 min (ACN/H₂O; 70:30), λ_{max}: 272 nm, 337 nm, 391 nm.

6-(2-Chlorphenyl)-5-cyan-3,8-dimethyl-1-oxo-10-phenyl-1*H*-pyrido[2'',3'':4',5']thieno-[3',2':5,6]pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-9-carbonsäureethylester (**92**)



3,6-Diamino-2-benzoyl-4-(2-chlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonitril (**42u**) (40.8 mg, 0.101 mmol), Acetessigsäureethylester (25.3 μ l, 0.200 mmol) und 4-Methylbenzolsulfonsäure (34.7 mg, 0.202 mmol) werden in Toluol (200 μ l) in der Synthese-Mikrowelle für 10 min bei 150 °C bestrahlt. Nach Abkühlen wird 0.3 ml Wasser hinzugegeben und mit 60 μ l Natriumhydroxidlösung (10%) neutralisiert. Der Niederschlag wird abgesaugt und aus Isopropanol umkristallisiert. Man erhält 19 mg (34%) eines gelben Pulvers

Schmp.: 287-288 °C; IR (KBr): ca. 2230 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$, sehr kleiner Peak), 1721 cm^{-1} und 1685 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz): δ (ppm) = 0.87 (t, 3 H, J = 7.2 Hz, CH_3 , Ethylester), 2.26 (s, 3 H, Pyridin- CH_3), 2.47 (d, 3 H, J = 0.8 Hz, Pyrimidin- CH_3), 4.03 (q, 2 H, J = 7.2 Hz, CH_2 , Ethylester), 6.66 (d, 1 H, J = 0.8 Hz, Pyrimidin-CH), 7.50-7.52 (m, 2 H, Phenyl-H), 7.55 (dd, 1 H, J = 7.7/1.5 Hz, 2-Chlorphenyl-H), 7.59-7.64 (m, 4 H, Phenyl-H und 2-Chlorphenyl-H überlagert), 7.68-7.71 (m, 1 H, 2-Chlorphenyl-H), 7.75 (dd, 1 H, J = 8.1/0.9 Hz, 2-Chlorphenyl-H); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150.9 MHz): δ (ppm) = 13.3 (CH_3 , Ethylester), 22.9 (Pyridin- CH_3), 23.8 (Pyrimidin- CH_3); 61.3 (CH_2 , Ethylester); 105.3 (Pyrimidin-CH); 127.3 127.8 (2 C), 128.9, 129.2 (2 C), 129.7, 129.8, 131.2 (tert. C); 107.3, 114.0, 119.9, 125.3, 129.0, 131.9, 133.1, 135.0, 142.5, 145.9, 146.1, 148.3, 150.8, 153.6, 159.1, 164.6, 166.9 (quart. C); $\text{C}_{31}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{S}$ (565.04); ber. ($\text{C}_{31}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{S} \times 1/5$ Isopropanol) C 65.77, H 3.91, N 9.71, S 5.56; gef. C 65.38, H 3.92, N 9.75, S 5.18; MS (EI): m/z (%) = 564 $[\text{M}]^{+}$ (3), 529 (100).

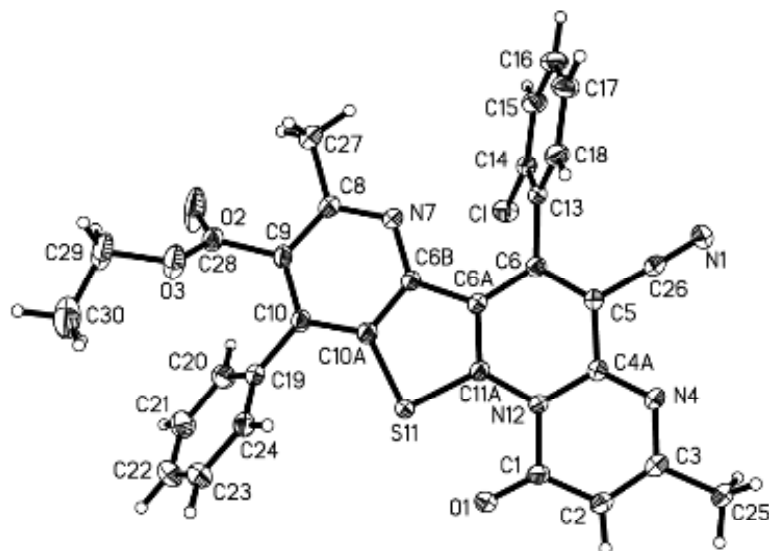


Abbildung 9-2: Röntgenkristallstruktur von **92^a**

^aDie kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

Tabelle 9-7: Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	$\text{C}_{31}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{S}$	
M_r	565.03	
Temperatur	100(2) K	
Wellenlänge	1.54184 Å	
Kristallsystem	Monoclinic	
Raumgruppe	P 21/c	
Gitterkonstanten	$a = 11.8137(4)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 16.8117(6)$ Å	$\beta = 96.255(2)^\circ$
	$c = 13.6345(4)$ Å	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	$2691.81(15)$ Å ³	
Z	4	
Dichte (berechnet)	1.394 Mg/m^3	
Absorptionskoeffizient	2.320 mm^{-1}	
F(000)	1168	
Kristallgröße	$0.10 \times 0.10 \times 0.08 \text{ mm}^3$	
θ -Bereich für Datensammlung	$3.76 \text{ bis } 75.91^\circ$	
Limitierende Indices	$-14 \leq h \leq 14, -21 \leq k \leq 15, -16 \leq l \leq 17$	

Zahl der Reflexe	21881
Unabhängige Reflexe	5574 [R(int) = 0.0388]
Vollständigkeit bis $\theta = 72.50^\circ$	99.9 %
Absorptionskorrektur	Semi-empirical from equivalents
Max. und Min. Transmission	1.00000 and 0.75367
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2
Daten/Einschränkungen/Parameter	5574 / 0 / 364
Goodness-of-fit on F^2	1.080
Final R indices [$ I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0465, wR2 = 0.1248
R indices (alle Daten)	R1 = 0.0577, wR2 = 0.1304
Größte Differenzpeaks	0.920 und -0.371 e.Å ⁻³

Tabelle 9-8: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter (Å² $\times 10^3$). U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} Tensors.^{a,b}

	x	y	z	U(eq)
S(11)	5735.1(4)	4989.6(3)	3118.4(4)	18.8(1)
Cl	3581.2(5)	2117.2(3)	2953.1(4)	28.3(1)
O(1)	4234.4(14)	6059.3(9)	3202.5(13)	29.6(4)
O(2)	9163.3(17)	2453.7(14)	1974.2(19)	60.7(7)
O(3)	9912.9(14)	3448.4(11)	2913.4(14)	36.3(4)
N(1)	1733.1(19)	2976.8(13)	5718.0(18)	38.1(5)
N(4)	2022.0(15)	4873.5(10)	4761.0(13)	21.4(4)
N(12)	3738.7(14)	4933.7(10)	3991.8(12)	18.2(3)
N(7)	6455.6(15)	2772.3(10)	3876.9(13)	20.8(4)
C(1)	3531.0(18)	5743.9(12)	3674.2(16)	21.8(4)
C(2)	2510.8(18)	6071.9(12)	3952.9(16)	23.5(4)
C(3)	1796.2(18)	5638.4(12)	4471.1(15)	21.8(4)
C(4A)	2960.5(17)	4539.8(12)	4524.2(14)	19.2(4)
C(5)	3205.6(17)	3727.2(12)	4797.4(15)	19.3(4)
C(6)	4158.4(17)	3332.3(12)	4563.8(14)	18.3(4)
C(6A)	4942.9(16)	3764.9(12)	4041.5(14)	17.9(4)
C(6B)	6010.5(17)	3503.5(12)	3726.9(14)	18.2(4)

C(8)	7430.5(18)	2618.7(13)	3500.1(16)	23.3(4)
C(9)	7974.5(18)	3193.4(13)	2948.7(16)	22.4(4)
C(10)	7523.3(18)	3952.5(12)	2792.3(15)	20.4(4)
C(10A)	6519.4(17)	4107.8(12)	3218.7(15)	19.9(4)
C(11A)	4714.5(17)	4545.7(12)	3765.2(14)	18.2(4)
C(13)	4310.4(17)	2481.7(12)	4848.6(15)	19.1(4)
C(14)	4015.3(18)	1875.1(12)	4172.7(15)	21.8(4)
C(15)	4038(2)	1084.9(13)	4454.9(17)	26.6(5)
C(16)	4364(2)	894.1(13)	5437.8(18)	30.1(5)
C(17)	4676(2)	1487.2(13)	6115.6(16)	28.1(5)
C(18)	4653.9(19)	2278.6(13)	5827.0(16)	24.4(4)
C(19)	8029.0(17)	4560.7(12)	2181.0(16)	22.5(4)
C(20)	8125(2)	4408.5(14)	1190.2(17)	29.3(5)
C(21)	8588(2)	4979.4(16)	613(2)	36.9(6)
C(22)	8966(2)	5697.3(15)	1024(2)	38.9(6)
C(23)	8878(2)	5851.4(14)	2008(2)	34.9(5)
C(24)	8399.9(18)	5290.1(13)	2591.3(17)	26.0(4)
C(25)	702.9(19)	5975.7(13)	4740.6(18)	27.7(5)
C(26)	2379.6(19)	3320.7(13)	5311.8(17)	25.5(4)
C(27)	7927(2)	1812.0(14)	3716.6(19)	31.7(5)
C(28)	9073.2(19)	2981.9(13)	2547.5(17)	26.0(5)
C(29)	11021(2)	3339.5(18)	2558(3)	46.3(7)
C(30)	11391(3)	4117(2)	2131(3)	55.3(8)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 9-9: Bindungslängen [Å]^{a,b}

S(11)-C(11A)	1.738(2)	O(2)-C(28)	1.195(3)
S(11)-C(10A)	1.746(2)	O(3)-C(28)	1.319(3)
Cl-C(14)	1.734(2)	O(3)-C(29)	1.455(3)
O(1)-C(1)	1.225(3)	N(1)-C(26)	1.147(3)

N(4)-C(4A)	1.314(3)	C(8)-C(27)	1.494(3)
N(4)-C(3)	1.363(3)	C(9)-C(10)	1.390(3)
N(12)-C(11A)	1.388(2)	C(9)-C(28)	1.505(3)
N(12)-C(4A)	1.398(3)	C(10)-C(10A)	1.401(3)
N(12)-C(1)	1.442(2)	C(10)-C(19)	1.485(3)
N(7)-C(8)	1.336(3)	C(13)-C(14)	1.393(3)
N(7)-C(6B)	1.344(3)	C(13)-C(18)	1.394(3)
C(1)-C(2)	1.415(3)	C(14)-C(15)	1.383(3)
C(2)-C(3)	1.369(3)	C(15)-C(16)	1.391(3)
C(3)-C(25)	1.493(3)	C(16)-C(17)	1.382(3)
C(4A)-C(5)	1.437(3)	C(17)-C(18)	1.387(3)
C(5)-C(6)	1.374(3)	C(19)-C(20)	1.392(3)
C(5)-C(26)	1.435(3)	C(19)-C(24)	1.398(3)
C(6)-C(6A)	1.428(3)	C(20)-C(21)	1.390(3)
C(6)-C(13)	1.487(3)	C(21)-C(22)	1.384(4)
C(6A)-C(11A)	1.384(3)	C(22)-C(23)	1.381(4)
C(6A)-C(6B)	1.444(3)	C(23)-C(24)	1.393(3)
C(6B)-C(10A)	1.402(3)	C(29)-C(30)	1.514(5)
C(8)-C(9)	1.420(3)		

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 9-10: Bindungswinkel [°]^{a,b}

C(11A)-S(11)-C(10A)	89.27(9)	O(1)-C(1)-N(12)	117.60(18)
C(28)-O(3)-C(29)	117.76(19)	C(2)-C(1)-N(12)	114.18(18)
C(4A)-N(4)-C(3)	118.37(18)	C(3)-C(2)-C(1)	121.51(19)
C(11A)-N(12)-C(4A)	120.12(16)	N(4)-C(3)-C(2)	122.67(19)
C(11A)-N(12)-C(1)	119.68(17)	N(4)-C(3)-C(25)	115.74(19)
C(4A)-N(12)-C(1)	120.21(17)	C(2)-C(3)-C(25)	121.58(19)
C(8)-N(7)-C(6B)	117.23(18)	N(4)-C(4A)-N(12)	123.05(18)
O(1)-C(1)-C(2)	128.2(2)	N(4)-C(4A)-C(5)	119.58(18)

N(12)-C(4A)-C(5)	117.35(17)	C(6A)-C(11A)-S(11)	114.83(15)
C(6)-C(5)-C(26)	120.06(18)	N(12)-C(11A)-S(11)	123.37(15)
C(6)-C(5)-C(4A)	123.12(18)	C(14)-C(13)-C(18)	118.66(19)
C(26)-C(5)-C(4A)	116.80(18)	C(14)-C(13)-C(6)	121.11(18)
C(5)-C(6)-C(6A)	117.52(18)	C(18)-C(13)-C(6)	119.97(18)
C(5)-C(6)-C(13)	118.86(18)	C(15)-C(14)-C(13)	121.6(2)
C(6A)-C(6)-C(13)	123.61(17)	C(15)-C(14)-Cl	119.14(17)
C(11A)-C(6A)-C(6)	120.07(18)	C(13)-C(14)-Cl	119.28(16)
C(11A)-C(6A)-C(6B)	111.00(17)	C(14)-C(15)-C(16)	119.0(2)
C(6)-C(6A)-C(6B)	128.92(18)	C(17)-C(16)-C(15)	120.2(2)
N(7)-C(6B)-C(10A)	123.81(18)	C(16)-C(17)-C(18)	120.5(2)
N(7)-C(6B)-C(6A)	124.97(18)	C(17)-C(18)-C(13)	120.1(2)
C(10A)-C(6B)-C(6A)	111.21(18)	C(20)-C(19)-C(24)	119.6(2)
N(7)-C(8)-C(9)	122.05(19)	C(20)-C(19)-C(10)	119.91(19)
N(7)-C(8)-C(27)	115.82(19)	C(24)-C(19)-C(10)	120.46(19)
C(9)-C(8)-C(27)	122.12(19)	C(21)-C(20)-C(19)	120.1(2)
C(10)-C(9)-C(8)	121.17(19)	C(22)-C(21)-C(20)	120.1(2)
C(10)-C(9)-C(28)	119.49(19)	C(23)-C(22)-C(21)	120.1(2)
C(8)-C(9)-C(28)	119.32(19)	C(22)-C(23)-C(24)	120.3(2)
C(9)-C(10)-C(10A)	115.79(19)	C(23)-C(24)-C(19)	119.7(2)
C(9)-C(10)-C(19)	123.17(18)	N(1)-C(26)-C(5)	178.2(2)
C(10A)-C(10)-C(19)	121.00(18)	O(2)-C(28)-O(3)	124.9(2)
C(10)-C(10A)-C(6B)	119.88(18)	O(2)-C(28)-C(9)	123.7(2)
C(10)-C(10A)-S(11)	126.28(16)	O(3)-C(28)-C(9)	111.40(18)
C(6B)-C(10A)-S(11)	113.69(15)	O(3)-C(29)-C(30)	109.1(2)
C(6A)-C(11A)-N(12)	121.80(18)		

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 9-11: Torsionswinkel [$^{\circ}$]^{a,b}

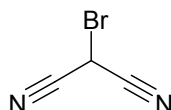
C(11A)-N(12)-C(1)-O(1)	0.5(3)	C(11A)-C(6A)-C(6B)-C(10A)	-0.6(2)
C(4A)-N(12)-C(1)-O(1)	-179.37(19)	C(6)-C(6A)-C(6B)-C(10A)	179.09(19)
C(11A)-N(12)-C(1)-C(2)	-179.87(18)	C(6B)-N(7)-C(8)-C(9)	-1.0(3)
C(4A)-N(12)-C(1)-C(2)	0.2(3)	C(6B)-N(7)-C(8)-C(27)	177.53(19)
O(1)-C(1)-C(2)-C(3)	179.0(2)	N(7)-C(8)-C(9)-C(10)	1.3(3)
N(12)-C(1)-C(2)-C(3)	-0.6(3)	C(27)-C(8)-C(9)-C(10)	-177.2(2)
C(4A)-N(4)-C(3)-C(2)	-0.6(3)	N(7)-C(8)-C(9)-C(28)	179.8(2)
C(4A)-N(4)-C(3)-C(25)	178.48(19)	C(27)-C(8)-C(9)-C(28)	1.4(3)
C(1)-C(2)-C(3)-N(4)	0.8(3)	C(8)-C(9)-C(10)-C(10A)	0.6(3)
C(1)-C(2)-C(3)-C(25)	-178.2(2)	C(28)-C(9)-C(10)-C(10A)	-177.93(19)
C(3)-N(4)-C(4A)-N(12)	0.2(3)	C(8)-C(9)-C(10)-C(19)	-176.9(2)
C(3)-N(4)-C(4A)-C(5)	-178.36(18)	C(28)-C(9)-C(10)-C(19)	4.5(3)
C(11A)-N(12)-C(4A)-N(4)	-179.95(18)	C(9)-C(10)-C(10A)-C(6B)	-2.7(3)
C(1)-N(12)-C(4A)-N(4)	-0.1(3)	C(19)-C(10)-C(10A)-C(6B)	174.97(19)
C(11A)-N(12)-C(4A)-C(5)	-1.4(3)	C(9)-C(10)-C(10A)-S(11)	-177.86(16)
C(1)-N(12)-C(4A)-C(5)	178.55(18)	C(19)-C(10)-C(10A)-S(11)	-0.2(3)
N(4)-C(4A)-C(5)-C(6)	178.94(19)	N(7)-C(6B)-C(10A)-C(10)	3.1(3)
N(12)-C(4A)-C(5)-C(6)	0.3(3)	C(6A)-C(6B)-C(10A)-C(10)	-175.49(18)
N(4)-C(4A)-C(5)-C(26)	0.9(3)	N(7)-C(6B)-C(10A)-S(11)	178.90(16)
N(12)-C(4A)-C(5)-C(26)	-177.77(18)	C(6A)-C(6B)-C(10A)-S(11)	0.3(2)
C(26)-C(5)-C(6)-C(6A)	179.27(19)	C(11A)-S(11)-C(10A)-C(10)	175.54(19)
C(4A)-C(5)-C(6)-C(6A)	1.3(3)	C(11A)-S(11)-C(10A)-C(6B)	0.07(16)
C(26)-C(5)-C(6)-C(13)	0.3(3)	C(6)-C(6A)-C(11A)-N(12)	0.8(3)
C(4A)-C(5)-C(6)-C(13)	-177.71(18)	C(6B)-C(6A)-C(11A)-N(12)	-179.48(17)
C(5)-C(6)-C(6A)-C(11A)	-1.8(3)	C(6)-C(6A)-C(11A)-S(11)	-179.04(15)
C(13)-C(6)-C(6A)-C(11A)	177.13(18)	C(6B)-C(6A)-C(11A)-S(11)	0.7(2)
C(5)-C(6)-C(6A)-C(6B)	178.52(19)	C(4A)-N(12)-C(11A)-C(6A)	0.8(3)
C(13)-C(6)-C(6A)-C(6B)	-2.6(3)	C(1)-N(12)-C(11A)-C(6A)	-179.06(18)
C(8)-N(7)-C(6B)-C(10A)	-1.2(3)	C(4A)-N(12)-C(11A)-S(11)	-179.35(14)
C(8)-N(7)-C(6B)-C(6A)	177.23(19)	C(1)-N(12)-C(11A)-S(11)	0.7(3)
C(11A)-C(6A)-C(6B)-N(7)	-179.20(19)	C(10A)-S(11)-C(11A)-C(6A)	-0.45(16)
C(6)-C(6A)-C(6B)-N(7)	0.5(3)	C(10A)-S(11)-C(11A)-N(12)	179.73(17)

C(5)-C(6)-C(13)-C(14)	98.1(2)	C(10A)-C(10)-C(19)-C(24)	61.9(3)
C(6A)-C(6)-C(13)-C(14)	-80.8(3)	C(24)-C(19)-C(20)-C(21)	0.0(3)
C(5)-C(6)-C(13)-C(18)	-76.0(3)	C(10)-C(19)-C(20)-C(21)	179.4(2)
C(6A)-C(6)-C(13)-C(18)	105.1(2)	C(19)-C(20)-C(21)-C(22)	0.7(4)
C(18)-C(13)-C(14)-C(15)	1.1(3)	C(20)-C(21)-C(22)-C(23)	-0.4(4)
C(6)-C(13)-C(14)-C(15)	-173.0(2)	C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	-0.6(4)
C(18)-C(13)-C(14)-Cl	179.78(16)	C(22)-C(23)-C(24)-C(19)	1.3(4)
C(6)-C(13)-C(14)-Cl	5.7(3)	C(20)-C(19)-C(24)-C(23)	-1.0(3)
C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	0.0(3)	C(10)-C(19)-C(24)-C(23)	179.6(2)
Cl-C(14)-C(15)-C(16)	-178.68(18)	C(6)-C(5)-C(26)-N(1)	-13(9)
C(14)-C(15)-C(16)-C(17)	-1.0(4)	C(4A)-C(5)-C(26)-N(1)	166(8)
C(15)-C(16)-C(17)-C(18)	0.9(4)	C(29)-O(3)-C(28)-O(2)	3.2(4)
C(16)-C(17)-C(18)-C(13)	0.2(4)	C(29)-O(3)-C(28)-C(9)	-177.2(2)
C(14)-C(13)-C(18)-C(17)	-1.2(3)	C(10)-C(9)-C(28)-O(2)	-120.6(3)
C(6)-C(13)-C(18)-C(17)	173.0(2)	C(8)-C(9)-C(28)-O(2)	60.8(4)
C(9)-C(10)-C(19)-C(20)	60.0(3)	C(10)-C(9)-C(28)-O(3)	59.8(3)
C(10A)-C(10)-C(19)-C(20)	-117.5(2)	C(8)-C(9)-C(28)-O(3)	-118.8(2)
C(9)-C(10)-C(19)-C(24)	-120.7(2)	C(28)-O(3)-C(29)-C(30)	122.7(3)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

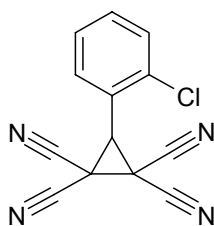
^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

2-Brommalonsäuredinitril (97)



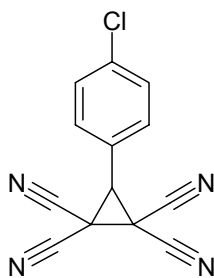
Zu einer Suspension von Malonsäuredinitril (1.32 g, 20.0 mmol) in Wasser (15 ml) wird langsam unter Eiskühlung Brom (1.03 ml, 20.0 mmol) hinzuge tropft. Die Mischung wird 4 h bei 0 °C gerührt. Nach Absaugen und Trocknen erhält man 1.73 g (60%) farblose Kristalle.

Schmp.: 62-64 °C (Lit.¹⁴¹: 64-65 °C).

3-(2-Chlorphenyl)cyclopropan-1,1,2,2-tetracarbonitril (**98a**)

Eine Lösung von Kaliumiodid (371 mg, 2.23 mmol) in Wasser (1.1 ml) wird bei Raumtemperatur zu einer Lösung von 2-Chlorbenzaldehyd (119 μ l, 1.06 mmol) und 2-Brommalonsäuredinitril (**97**) (307 mg, 2.12 mmol) in Ethanol (1.1 ml) getropft. Die Mischung wird 30 min gerührt. Nach Absaugen, Waschen mit Wasser und Petrolether und anschließender Umkristallisation aus Ethanol 96% erhält man 209 mg (78%) weiße, feine Kristalle.

Schmp.: 248-249 °C (Lit.¹⁷⁶: 246-248 °C); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 5.45 (s, 1 H, Cyclopropyl-CH), 7.50-7.60 (m, 2 H, ArH), 7.72 (dd, 1 H, *J* = 7.8/1.3 Hz, ArH), 8.03-8.06 (m, 1 H, ArH); C₁₃H₅ClN₄ (252.66); ¹H-NMR-Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.¹⁷⁷

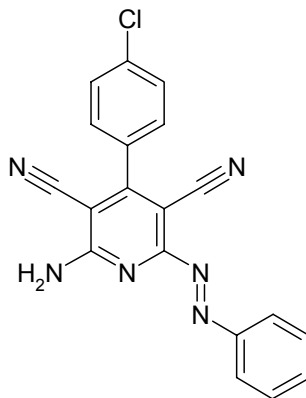
3-(4-Chlorphenyl)cyclopropan-1,1,2,2-tetracarbonitril (**98b**)

Eine Lösung von Kaliumiodid (700 mg, 4.22 mmol) in 2 ml Wasser wird bei Raumtemperatur zu einer Lösung von 4-Chlorbenzaldehyd (281 mg, 2.00 mmol) und 2-Brommalonsäuredinitril (**97**) (582 mg, 4.01 mmol) in Ethanol (2 ml) getropft. Die Mischung wird 30 min gerührt. Nach Absaugen, Waschen mit Wasser und Petrolether und anschließender Umkristallisation aus Ethanol erhält man 347 mg (69%) weiße, feine Kristalle.

Schmp.: 254-255 °C (Lit.¹⁷⁶: 248-250 °C); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm) = 5.29 (s, 1 H, Cyclopropyl-CH), 7.58-7.61 (m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 7.88-7.91

(m, 2 H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH); C₁₃H₅ClN₄ (252.66); ¹H-NMR-Daten stimmen mit Literaturangaben überein.¹⁷⁷

2-Amino-4-(4-chlorphenyl)-6-[(E)-phenyldiazenyl]pyridin-3,5-dicarbonitril (**102**)



Nach AAV 8 aus 3-(4-Chlorphenyl)cyclopropan-1,1,2,2-tetracarbonitril (**98b**) (253 mg, 1.00 mmol) und Phenylhydrazin (149 µl, 1.50 mmol). Nach Umkristallisation aus Methanol erhält man 48.3 mg (13%) rote Kristalle.

Schmp.: 275-276 °C unter Zersetzung; IR (KBr): 3490 cm⁻¹, 3278 cm⁻¹ und 3147 cm⁻¹ (NH), 2225 cm⁻¹ (Doppelpeak, C≡N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 7.68-7.76 (m, 7 H, ArH), 7.97-7.99 (m, 2 H, ArH), 8.11 (m, 1 H, NH, Signallöschung bei D₂O-Zugabe), 8.69 (m, 1 H, NH, Signallöschung bei D₂O-Zugabe); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 123.4 (2 C), 128.9 (2 C), 129.9 (2 C), 130.5 (2 C), 134.1 (tert. C); 91.2, 93.0, 114.6, 114.7, 132.5, 135.4, 151.7, 159.2, 160.6, 164.6 (quart. C); C₁₉H₁₁ClN₆ (358.78); ber. C 63.60, H 3.09, N 23.42; gef. C 63.53, H 2.99, N 22.91; MS (EI): m/z (%) = 360 (10), 358 (2), 105 (59), 77 (100), MS (ESI): m/z (%) = 739 [2M+Na]⁺ (37), 381 [M+Na]⁺ (100); HPLC: 99.0% bei 254 nm und 99.0% bei 280 nm, t_N = 4.63 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max}: 252 nm, 296 nm, 394.

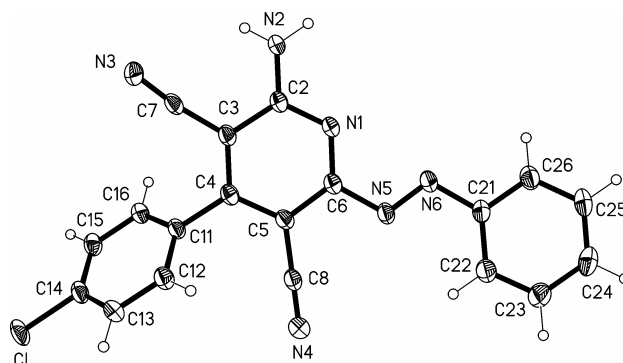


Abbildung 9-3: Röntgenkristallstruktur von **102^a**

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

Tabelle 9-12: Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	$\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{ClN}_6$	
M_r	358.79	
Temperatur	100(2) K	
Wellenlänge	1.54184 Å	
Kristallsystem	Monoclinic	
Raumgruppe	P2/n	
Gitterkonstanten	$a = 12.2186(3)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 6.7523(2)$ Å	$\beta = 102.456(3)^\circ$
	$c = 21.3737(6)$ Å	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	$1721.90(8)$ Å ³	
Z	4	
Dichte (berechnet)	1.384 Mg/m^3	
Absorptionskoeffizient	2.089 mm^{-1}	
$F(000)$	736	
Kristallgröße	$0.12 \times 0.10 \times 0.03 \text{ mm}^3$	
θ -Bereich für Datensammlung	3.85 bis 75.82°	
Limitierende Indices	$-15 \leq h \leq 15$, $-7 \leq k \leq 8$, $-26 \leq l \leq 26$	
Zahl der Reflexe	27195	
Unabhängige Reflexe	3528 [$R(\text{int}) = 0.0472$]	
Vollständigkeit bis $\theta = 72.50^\circ$	99.3 %	

Absorptionskorrektur	Semi-empirical from equivalents
Max. und Min. Transmission	1.00000 und 0.70525
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2
Daten/Einschränkungen/Parameter	3528 / 0 / 243
Goodness-of-fit on F^2	1.082
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0.0342$, $wR2 = 0.0949$
R indices (alle Daten)	$R1 = 0.0391$, $wR2 = 0.0979$
Größte Differenzpeaks	0.221 und -0.248 e.Å ⁻³

Tabelle 9-13: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). $U(\text{eq})$ ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} Tensors.^{a,b}

	x	y	z	U(eq)
C(2)	1310.9(10)	292.5(19)	4471.1(6)	22.2(3)
C(3)	2270.8(10)	506.8(19)	4190.2(6)	22.2(3)
C(4)	2381.6(10)	2144.2(19)	3815.4(6)	21.5(3)
C(5)	1542.6(10)	3613.7(19)	3760.4(6)	21.9(3)
C(6)	649.7(10)	3314.7(19)	4067.7(6)	22.0(3)
C(7)	3130.1(10)	-966.9(19)	4358.1(6)	24.0(3)
C(8)	1556.6(10)	5375(2)	3384.5(6)	23.7(3)
C(11)	3335.2(10)	2295.0(19)	3487.7(6)	21.8(3)
C(12)	3987.0(11)	4003(2)	3534.6(6)	25.9(3)
C(13)	4858.3(11)	4136(2)	3210.6(7)	27.3(3)
C(14)	5052.5(11)	2553(2)	2837.4(6)	25.4(3)
C(15)	4422.2(11)	841(2)	2784.1(6)	25.3(3)
C(16)	3559.2(10)	706.6(19)	3113.5(6)	22.9(3)
C(21)	-1763.4(10)	6167(2)	4142.5(6)	24.6(3)
C(22)	-1646.6(12)	7926(2)	3814.7(7)	31.3(3)
C(23)	-2452.0(13)	9386(2)	3773.9(7)	37.1(3)
C(24)	-3368.0(12)	9125(2)	4055.9(7)	34.8(3)
C(25)	-3489.8(12)	7384(2)	4378.4(7)	31.6(3)
C(26)	-2688.2(11)	5900(2)	4417.2(7)	29.0(3)
N(1)	522.0(8)	1710.4(16)	4407.9(5)	22.3(2)

N(2)	1179.5(10)	-1323.7(18)	4804.4(5)	26.3(2)
N(3)	3767.9(10)	-2188.9(18)	4550.2(6)	29.3(3)
N(4)	1580.3(10)	6796.1(18)	3089.5(6)	30.4(3)
N(5)	-143.1(9)	4896.0(16)	3986.5(5)	23.3(2)
N(6)	-979.2(9)	4575.1(17)	4227.4(5)	24.8(2)
Cl	6133.7(3)	2738.1(6)	2425.6(2)	34.5(1)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 9-14: Bindungslängen [Å]^{a,b}

C(2)-N(2)	1.3318(17)	C(11)-C(16)	1.3998(17)
C(2)-N(1)	1.3446(16)	C(12)-C(13)	1.3925(18)
C(2)-C(3)	1.4355(16)	C(13)-C(14)	1.3844(19)
C(3)-C(4)	1.3889(18)	C(14)-C(15)	1.3805(19)
C(3)-C(7)	1.4348(18)	C(14)-Cl	1.7427(13)
C(4)-C(5)	1.4132(18)	C(15)-C(16)	1.3913(17)
C(4)-C(11)	1.4869(16)	C(21)-C(26)	1.3929(18)
C(5)-C(6)	1.4042(17)	C(21)-C(22)	1.4016(19)
C(5)-C(8)	1.4375(18)	C(21)-N(6)	1.4255(16)
C(6)-N(1)	1.3325(17)	C(22)-C(23)	1.382(2)
C(6)-N(5)	1.4269(16)	C(23)-C(24)	1.392(2)
C(7)-N(3)	1.1483(18)	C(24)-C(25)	1.387(2)
C(8)-N(4)	1.1519(18)	C(25)-C(26)	1.3912(19)
C(11)-C(12)	1.3928(18)	N(5)-N(6)	1.2580(15)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 9-15: Bindungswinkel [$^{\circ}$]^{a,b}

N(2)-C(2)-N(1)	118.07(11)	C(16)-C(11)-C(4)	119.10(11)
N(2)-C(2)-C(3)	120.66(11)	C(13)-C(12)-C(11)	120.29(12)
N(1)-C(2)-C(3)	121.27(11)	C(14)-C(13)-C(12)	118.76(12)
C(4)-C(3)-C(7)	122.63(11)	C(15)-C(14)-C(13)	122.16(12)
C(4)-C(3)-C(2)	120.76(11)	C(15)-C(14)-Cl	119.24(10)
C(7)-C(3)-C(2)	116.44(11)	C(13)-C(14)-Cl	118.59(10)
C(3)-C(4)-C(5)	116.60(11)	C(14)-C(15)-C(16)	118.88(12)
C(3)-C(4)-C(11)	120.66(11)	C(15)-C(16)-C(11)	120.15(12)
C(5)-C(4)-C(11)	122.74(11)	C(26)-C(21)-C(22)	120.00(12)
C(6)-C(5)-C(4)	118.88(11)	C(26)-C(21)-N(6)	115.64(12)
C(6)-C(5)-C(8)	118.98(11)	C(22)-C(21)-N(6)	124.36(12)
C(4)-C(5)-C(8)	122.11(11)	C(23)-C(22)-C(21)	119.19(13)
N(1)-C(6)-C(5)	124.50(11)	C(22)-C(23)-C(24)	120.70(14)
N(1)-C(6)-N(5)	121.23(11)	C(25)-C(24)-C(23)	120.32(13)
C(5)-C(6)-N(5)	114.27(11)	C(24)-C(25)-C(26)	119.38(13)
N(3)-C(7)-C(3)	172.43(13)	C(25)-C(26)-C(21)	120.41(13)
N(4)-C(8)-C(5)	179.05(15)	C(6)-N(1)-C(2)	117.89(10)
C(12)-C(11)-C(16)	119.76(11)	N(6)-N(5)-C(6)	114.28(10)
C(12)-C(11)-C(4)	121.12(11)	N(5)-N(6)-C(21)	113.64(11)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 9-16: Torsionswinkel [$^{\circ}$]^{a,b}

N(2)-C(2)-C(3)-C(4)	176.72(12)	C(7)-C(3)-C(4)-C(11)	9.16(19)
N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-3.46(19)	C(2)-C(3)-C(4)-C(11)	-175.68(11)
N(2)-C(2)-C(3)-C(7)	-7.83(18)	C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	-1.61(17)
N(1)-C(2)-C(3)-C(7)	171.99(11)	C(11)-C(4)-C(5)-C(6)	177.68(11)
C(7)-C(3)-C(4)-C(5)	-171.53(11)	C(3)-C(4)-C(5)-C(8)	-179.70(11)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	3.63(18)	C(11)-C(4)-C(5)-C(8)	-0.41(19)

C(4)-C(5)-C(6)-N(1)	-0.83(19)	C(12)-C(11)-C(16)-C(15)	-0.67(19)
C(8)-C(5)-C(6)-N(1)	177.32(12)	C(4)-C(11)-C(16)-C(15)	177.74(11)
C(4)-C(5)-C(6)-N(5)	179.42(10)	C(26)-C(21)-C(22)-C(23)	0.6(2)
C(8)-C(5)-C(6)-N(5)	-2.43(17)	N(6)-C(21)-C(22)-C(23)	-178.72(13)
C(4)-C(3)-C(7)-N(3)	155.0(10)	C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	0.2(2)
C(2)-C(3)-C(7)-N(3)	-20.3(11)	C(22)-C(23)-C(24)-C(25)	-0.5(2)
C(6)-C(5)-C(8)-N(4)	111(9)	C(23)-C(24)-C(25)-C(26)	0.0(2)
C(4)-C(5)-C(8)-N(4)	-71(9)	C(24)-C(25)-C(26)-C(21)	0.9(2)
C(3)-C(4)-C(11)-C(12)	-130.61(13)	C(22)-C(21)-C(26)-C(25)	-1.1(2)
C(5)-C(4)-C(11)-C(12)	50.13(18)	N(6)-C(21)-C(26)-C(25)	178.23(12)
C(3)-C(4)-C(11)-C(16)	51.00(17)	C(5)-C(6)-N(1)-C(2)	1.16(18)
C(5)-C(4)-C(11)-C(16)	-128.27(13)	N(5)-C(6)-N(1)-C(2)	-179.10(11)
C(16)-C(11)-C(12)-C(13)	0.07(19)	N(2)-C(2)-N(1)-C(6)	-179.22(11)
C(4)-C(11)-C(12)-C(13)	-178.31(12)	C(3)-C(2)-N(1)-C(6)	0.95(17)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	0.7(2)	N(1)-C(6)-N(5)-N(6)	-4.01(17)
C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	-1.0(2)	C(5)-C(6)-N(5)-N(6)	175.75(11)
C(12)-C(13)-C(14)-Cl	179.29(10)	C(6)-N(5)-N(6)-C(21)	180.00(10)
C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	0.39(19)	C(26)-C(21)-N(6)-N(5)	-178.29(11)
Cl-C(14)-C(15)-C(16)	-179.88(10)	C(22)-C(21)-N(6)-N(5)	1.05(18)
C(14)-C(15)-C(16)-C(11)	0.45(18)		

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 9-17: Wasserstoffbrückenbindungen [\AA und $^\circ$]^{a,b}

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(2)-H(01)...N(1)#1	0.89(2)	2.07(2)	2.9554(15)	175.1(17)
N(2)-H(01)...N(6)#1	0.89(2)	2.652(19)	3.0629(16)	109.3(14)
N(2)-H(02)...N(3)	0.84(2)	2.78(2)	3.3734(16)	128.9(16)
C(12)-H(12)...N(3)#2	0.95	2.47	3.4127(18)	170.5
C(25)-H(25)...N(3)#3	0.95	2.61	3.4607(18)	149.2
C(15)-H(15)...N(4)#4	0.95	2.64	3.3851(18)	135.8
C(16)-H(16)...N(4)#5	0.95	2.64	3.5732(18)	167.3

Benutzte Symmetrietransformationen für die Generierung äquivalenter Atome:

#1 -x,-y,-z+1

#2 x,y+1,z

#3 x-1,y+1,z

#4 -x+1/2,y-1,-z+1/2

#5 x,y-1,z

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Anhang zu Abschnitt 9.2: Chemikalien mit besonderem Gefährdungspotential

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Gefahrstoffe müssen unter Beachtung der einschlägigen Gefahrenhinweise und Sicherheitsregeln (R- und S-Sätze) gehandhabt werden. Bei der Verwendung der im Folgenden aufgeführten Chemikalien sind besondere Gefahren zu beachten.

Die Kennzeichnung und Einstufung der Substanzen richtet sich nach der EG-Richtlinie 67/548/EG. Diese wird durch die neue Verordnung über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP, Regulation on Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures), die am 20. Januar 2009 in Kraft getreten ist, abgelöst. Nach Ablauf der Übergangsfrist (ab dem 01. Dezember 2010) müssen Stoffe und Gemische nach der neuen Verordnung gekennzeichnet werden.

4-Chloranilin

T Giftig, N Umweltgefährdend

R 45-23/24/25-50/53:

Kann Krebs erzeugen - Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut - Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich - Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

S 53-45-60-61:

Exposition vermeiden - Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen) - Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen - Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Brom

T+ Sehr giftig, C Ätzend, N Umweltgefährdend

R 26-35-50:

Sehr giftig beim Einatmen - Verursacht schwere Verätzungen - Sehr giftig für Wasserorganismen.

S 7/9-26-45-61:

Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren - Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen) - Freisetzung in die

Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Chloracetonitril

T Giftig, N Umweltgefährdend

R 23/24/25-51/53:

Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut - Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

S 45-61:

Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen) - Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Dichlormethan

Xn Gesundheitsschädlich

R 40:

Verdacht auf krebserzeugende Wirkung

S 23.2-24/25-36/37:

Dampf nicht einatmen - Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden - Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

N,N-Dimethylformamid

T Giftig

R 61-E20/21-36:

Kann das Kind im Mutterleib schädigen - Auch gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut - Reizt die Augen.

S 53-45:

Exposition vermeiden - Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Malonsäuredinitril

T Giftig, N Umweltgefährdend

R 23/24/25-50/53:

Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut - Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

S 23-27-45-60-61:

Dampf nicht einatmen - Beschmutzte Kleidung sofort ausziehen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen) - Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen - Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Methanol

F Leichtentzündlich, T Giftig

R 11-23/24/25-39/23/24/25:

Leichtentzündlich - Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut - Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

S 7-16-36/37-45:

Behälter dicht geschlossen halten - Von Zündquellen fernhalten-nicht rauchen - Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Phenylhydrazin und seine Derivate

T Giftig, N Umweltgefährdend

R 45-E23/24/25-36/38-43-E48/23/24/25-50-68:

Kann Krebs erzeugen - Auch giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut - Reizt die Augen und die Haut - Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich - Auch giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken - Sehr giftig für Wasserorganismen - Irreversibler Schaden möglich.

S 53-45-61:

Exposition vermeiden - Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen) - Freisetzung in die

Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Piperidin

F Leichtentzündlich, T Giftig

R 11-23/24-34:

Leichtentzündlich - Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut - Verursacht Verätzungen.

S 16-26-27-45:

Von Zündquellen fernhalten-nicht rauchen - Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren - Beschmutzte, durchtränkte Kleidung sofort ausziehen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Thiophenol

T+ Sehr giftig

R 10-24/25-26-36/38:

Entzündlich - Giftig bei Berührung mit der Haut und bei Verschlucken - Sehr giftig beim Einatmen - Reizt die Augen und die Haut.

S 26-28-36/37-45:

Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren - Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser - Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

9.3 Biologische Daten

9.3.1 GSK-3-Assays

Die Bestimmungen der Kinaseaktivitäten wurden von der Arbeitsgruppe von Laurent Meijer in den Laboratorien der Station Biologique in Roscoff durchgeführt.

Für die Kinaseaktivitäts-Tests wurden die isolierten Enzyme vorliegend in einem Puffer benötigt:

*Pf*GSK-3 wurde durch das Vektorplasmid pBAD/Thio-TOPO in *E. coli* als *(His)₆-tagged Pf*GSK-3 exprimiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation gewonnen, homogenisiert und durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose-Kügelchen (Nickel-beladenes Harz zur Reinigung von Proteinen mit Polyhistidin-Sequenz) gereinigt (Elution durch Imidazol). Von den einzelnen Elutionsfraktionen wurden die Kinaseaktivitäten nach dem oben beschriebenen Schema mit verschiedenen zugesetzten Volumina an Enzymlösung bestimmt. Die Radioaktivität in CPM (counts per minute) wurde gegen das zugesetzte Volumen an Enzymlösung aufgetragen. Das einzusetzende Volumen für die weiteren Aktivitätsbestimmungen zur Ermittlung der IC₅₀-Werte sollte ein Signal von 10000 bis 15000 CPM hervorrufen, das sich in der Kurve vor dem Plateau befindet.

GSK-3 wurde aus Schweinehirn durch Reinigung mittels Affinitätschromatographie gewonnen. Dazu wurde Axin zunächst an Ni-NTA-Agarose-Kügelchen immobilisiert, um dann mit dem Lysat aus Schweinehirn in Kontakt gebracht zu werden. Die Elution erfolgte mit Imidazol. Die Messung der Kinaseaktivität der Elutionsfraktionen zur Ermittlung des einzusetzenden Volumens für die Bestimmung der IC₅₀-Werte der Verbindungen folgte dem oben genannten Schema.

Die Kinaseaktivitäten der beiden Enzyme *Pf*GSK-3 und GSK-3 wurden in einem Kinasepuffer (pH 7.5, 25 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM EGTA, 5 mM DTT, 0.5 mg BSA/ml, 50 µg Heparin/ml) mit 40 µM GS-1 als Substrat, 15 µM [γ -³³P] ATP (3,000 Ci/mmol, 10mCi/ml) in einem endgültigen Volumen von 30 µl bestimmt. Zur Ermittlung der IC₅₀-Werte wurden Enzymaktivitäten bei acht verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen

gemessen. Für jede Konzentration wurden Dreifachbestimmungen angefertigt und pro Verdünnungsreihe wurde eine Positivkontrolle ohne Zusatz von Inhibitor und eine Negativkontrolle ohne Enzym vorgenommen. Die Verbindungen wurden als Lösung in DMSO (1% Endkonzentration) eingesetzt. Nach einer Inkubation bei 30 °C für 30 Minuten wurden 25 µl der Lösung auf Whatman P81 Phosphocellulose Papier (ca. 2.5 x 3 cm) gegeben, wodurch die Reaktion gestoppt wurde. Die Papiere wurden fünfmal für 5 Minuten in 1%iger Phosphorsäure gewaschen. Die nassen Papiere wurden anschließend mit 1 ml ACS (Amersham) Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivitäten, die sich proportional zum inkorporierten Phosphat verhalten, bestimmt. Nach Abzug der Blindwerte wurde die Kinaseaktivität in pmol durch GS-1 aufgenommenes Phosphat oder prozentual zur maximalen Enzymaktivität (Positivkontrolle) angegeben und senkrecht zur Konzentration aufgetragen. Aus der Kurve kann bei der Enzymaktivität von 50% der IC₅₀-Wert abgelesen werden.^{40,55}

Tabelle 9-18: IC₅₀-Werte der getesteten Verbindungen für die Kinasen *Pf*GSK-3 und GSK-3 [μ M]

Verbindung	<i>Pf</i> GSK-3	GSK-3	Verbindung	<i>Pf</i> GSK-3	GSK-3
41	0.43, 1.6 ¹⁾	>100, >10 ¹⁾	42a'	0.91	>10
42a	6 ²⁾	>100 ²⁾	42b'	>100	>100
42b	>10	>10	42c'	10	>100
42c	>10	>10	42d'	2.2	>100
42d	>10	>10	42f'	>10	>10
42e	>10	>10	43a	>10	>10
42f	8.5	>100	43b	>10	>10
42g	>10	>10	43c	>10	>10
42h	>10	>10	44a	>10	>10
42i	2.4	>10	44b	>10	>10
42j	1.7	>10	44c	0.8	1.3
42k	3.2	>10	44d	0.13	0.4
42l	>10	>10	44e	>10	>10
42m	0.91	>10	44f	0.51 ²⁾	2
42n	>10	>10	44g	0.18	2.3
42o	70	>100	44h	1.6	3.5
42p	>10	>10	44i	>10	>10
42q	1.1	>10	45a	>10	>10
42r	>100	>100	45b	>10	>10
42s	0.61	>10	45c	>10	>10
42t	3.8	>10	46a	>100	>100
42v	0.48, 0.06 ³⁾	>10	46b	>10	>10
42w	2.7	>10	77	≈ 10 ⁴⁾	>10
42x	1.7	>10	78	0.13	0.06
42y	2.2	>10	81	>10	>10
42z	0.5	>10			

¹⁾ Erster Wert aus Hochdurchsatz-Screening, zweiter Wert: im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Charge

²⁾ Bestimmung in 10% DMSO-Endkonzentration.

³⁾ Zweiter Wert aus Wiederholungstestung mit einem zeitlichen Abstand von 10 Monaten zur ersten Testung

⁴⁾ Es wurde keine IC₅₀-Bestimmung vorgenommen. Bestimmt wurde die Restaktivität bei einer Konzentration von 10 μ M, diese betrug 50%.

9.3.2 Kinaseassays zur Untersuchung der potentiellen RET-Inhibitoren

Die rekombinanten Proteinkinaseendomänen von humaner RET (aa 700-1020, NP_066124), ALK (aa 1103-1459, NP_004295) und ABL (aa 230-517, Isoform a, NP_005148) wurden in Sf9 Insektenzellen mit poly-Histidin-Tag am aminoterminalen Ende exprimiert und wie beschrieben gereinigt.¹⁷⁸

Die ELISA-Kinaseassays wurden wie beschrieben durchgeführt.¹⁷⁸ Dabei wurden ca. 1 pmol rekombinantes Enzym und 1 nmol Peptidsubstrat eingesetzt. Die Enzyme wurden in einem Puffer (25 mM Hepes pH 7, 1 mM MnCl₂, 5 mM MgCl₂) mit den zu testenden Verbindungen und 300 µM ATP für 15 min bei 30 °C inkubiert in einem *96-well plate*, das vorher mit Peptidsubstrat beschichtet wurde. Nach fünfmaligem Waschen mit Wasch-Puffer (0.05% Tween in PBS) wurde mit primärem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (Klon 4G10, Millipore) und sekundärem HRP-konjugiertem Antimaus-Antikörper inkubiert. Ein colorimetrisches Signal wurde durch Zugabe von TMB Substrat (Pierce) entwickelt und mit 0.1 M H₂SO₄ gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm mit einem *96-well microplate reader* (Bio-Rad) bestimmt. Als Substrat wurde ein Peptid verwendet, das sich aus dem *activation loop* von ALK ableitet.¹⁷⁹ Es erfolgten Doppelbestimmung und jede Konzentration wurde mindestens dreimal vermessen.

9.3.3 Zelltests

TPC1-Zellen wurden in DMEM-Medium unter Zusatz von 10% fetalem Kalbserum, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Gentamicin und 2mM Glutamin kultiviert. RET-negative LS174T-Zellen wurden in RPMI-1640 unter Zusatz von 10% Serum und Antibiotika kultiviert. Das Zellwachstum wurde unter Anwendung des Tritium-Thymidin-Inkorporationsassays gemessen. Verdünnungsreihen der zu testenden Verbindungen wurden direkt in *96-well plates* in DMSO hergestellt. Die Zellen (10⁴/well) wurden hinzugefügt und 72 h inkubiert. Die Zellen wurden während der letzten 8 Stunden mit Tritium-Thymidin (³H-T) (1 µCi/well) behandelt und anschließend auf Glasfaser-Filterpapier geerntet. Die Radioaktivität in den Zellen wurde durch Flüssig-Szintillation gemessen. Die prozentuale Hemmung der ³H-T-Aufnahme durch die verschiedenen Inhibitor-konzentrationen in Bezug auf die ³H-T-Aufnahme durch unbehandelte Kontrollzellen wurde berechnet. Die Experimente wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die entsprechenden IC₅₀-Werte in Tabelle 9-14 stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

Tabelle 9-19: IC₅₀-Werte der untersuchten Verbindungen für die Kinasen RET, ALK und ABL sowie Hemmung des Zellwachstums von TPC1- und LS174T-Zellen [µM]

Verbindung	RET	ALK	ABL	TPC1 [RET+]	LS174T [RET-]
51a	8				
51b	10				
51c	2.5	2.2	37	123	>300
52a	2.3	9.7	60	19	88
52b	8.6				
52c	7.9				
52d	14				
53	27				
54a	19				
54b	8.3				
54c	13				
54d	11				
54e	9.2				
54f	8.7				
54g	13				
55a	2.3	6.6	50	205	>300
55b	>100				
55c	10				
55d	6				
55e	3.4	4.0	74	236	>300
55f	0.69	2.0	72	18	6.2
55g	3.6				
55h	5				
55i	39				
55j	3.6				
55k	26				

9.4 Docking

9.4.1 PfGSK-3

Auswahl und Vorbereitung der Strukturen

Proteine: Es wurde in zehn beschriebenen Homogiemodelle¹⁵⁵ gedockt. Dabei wurde für das Docking mit FlexE¹⁸⁰ (Modul von FlexX^{181,182}) ein Ensemble aus den zehn besten Modellen verschiedener Vorlagen gewählt. Zusätzlich wurde als elfte Struktur ein Modell ergänzt, das auf der Kristallstruktur von **44d** in HsGSK-3 (Anselm Oberholzer, Laurent Meijer; persönliche Mitteilung) beruht. Die Bindetasche der Proteine wurden jeweils visuell mit FlexX 3.0.2 auf Abweichungen von den standardisierten Einstellungen für Torsionswinkel und Protonierungszustände geprüft, entsprechende Ausnahmen wurden beim Docking berücksichtigt.

Für das Docking mit Autodock4¹⁸³ wurden die auf 1j1b, 1q3d, 1q41, 2ow3 und der Kristallstruktur nach Oberholzer beruhenden Modelle verwendet. Es wurde die in AutoDockTools 1.5.2¹⁸⁴ dokumentierte Routine zur Vorbereitung des Proteins genutzt (Prüfung auf fehlerhafte Strukturelemente, Ergänzen polarer Wasserstoffe, Zuweisung von Kollmann united atom charges).

Liganden: Es wurden die Verbindungen **41**, **42j** und **44d** gedockt. Die Strukturen wurden in Sybyl 8.0¹⁸⁵ konstruiert, Gasteiger Ladungen zugewiesen und eine kurze Minimierung vorgenommen (Methode: Powell mit initialer Simplex-Minimierung, Tripos Kraftfeld, Beendigung bei einem Gradienten ≤ 0.05 kcal/mol mit maximal 1000 Iterationen). Die als mol2-File abgelegten Moleküle wurden direkt für FlexE verwendet.

Für Autodock4 konnte wiederum ausgehend von den für FlexX vorbereiteten Molekülen eine in AutoDockTools verfügbare Routine angewendet werden (Entfernen nichtpolarer Wasserstoffe, da die Berechnungen nach united atom model vorgenommen werden, Zuweisung rotierbarer Bindungen). Zusätzlich musste manuell die Bindung zwischen dem Thienopyridin und dem in Position 4 befindlichen Aromaten als rotierbar definiert werden.

Durchführung des Docking

Docking mit FlexE: Da die im Ensemble verwendeten Strukturen sich insbesondere im Bereich des *glycine-rich-loops* auch hinsichtlich des *backbones* unterscheiden, wurden einige Parameter angepasst, um ein Ensemble zu der von FlexE ermittelten *united protei structure* zusammenführen zu können.

Das darauffolgende FlexX Docking wurde nach automatischer Auswahl des Basisfragmentes und Platzierung desselben mittels *triangle matching* durchgeführt. Es wurden jeweils 100 Lösungen betrachtet, indem Cluster nach rms-Abweichungen gebildet wurden, die dann als hypothetische Bindungsmodi betrachtet und mit Autodock4-Lösungen verglichen wurden.

Docking mit AutoDock4: Es wurde zunächst mit einer Auflösung von 0.375 Å das Gitter an Interaktionsenergien mit den im Ligand aufgefundenen Atomtypen mittels autogrid (integriert Autodock4) berechnet. Das Zentrum der zu berechnenden Box wurde als absolute Koordinate anhand des in 1j1b kokristallisierten ANP festgelegt, es werden 60 X 60 X 60 Gitterpunkte berechnet.

Dann wurde das eigentliche Docking mit dem implementierten *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) durchgeführt, wichtige Parameter für den genetischen Algorithmus sind dabei vor allem: Populationsgröße: 150, maximale Anzahl an Energieberechnungen pro Generation: 250000, maximale Generationsanzahl: 27000, Mutationsrate: 0.02, Crossoverrate: 0.8. Es wurden jeweils 50 Lösungen berechnet.

Es wurde jeweils mit rigidem Rezeptor und mit frei beweglichem Lys108, Met157, Thr163, Lys166 und Gln210 gedockt.

Bewertung der Posen:

Fünf potentielle Bindungsmodi, die sich durch Häufigkeit und bekannte Interaktionsmuster auszeichneten, darunter die in Abschnitt 6.1.5 beschriebenen, wurden mit den in FlexX und AutoDock4 integrierten Scoring Funktionen und zusätzlich mit DrugScore^{186,187} bewertet.

Die Verbindung **42v** wurde nachträglich einzeln mit FlexX in einzelne Proteine gedockt. Die Aufbereitung der Proteine und des Liganden erfolgte dabei nach den oben genannten Schemata.

9.4.2 RET

Die Verbindungen **55e**, **55f** und **52a** wurden mit FlexX in die verschiedenen Strukturen der RET gedockt (PDB-Codes: 2ivs, 2ivt, 2ivu, 2ivv¹⁶⁹). Die Aufbereitung der Liganden und Proteine erfolgte dabei nach den in Abschnitt 9.4.3 beschriebenen Schemata.

10 Literaturverzeichnis

1. Sachsenmaier, C.: Targeting protein kinases for tumor therapy. *Onkologie* **2001**, 24, 346-355.
2. Melnikova, I., Golden, J.: Targeting protein kinases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 993-994.
3. Hanks, S. K., Hunter, T.: The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **1995**, 9, 576-596.
4. *World Malaria Report 2008*. World Health Organization, **2008**, Geneva, Switzerland.
5. Hammarton, T. C., Mottram, J. C., Doerig, C.: The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. In: *Progress in cell cycle research*, Vol 5, Hrsg.: Meijer, L., Jézéquel, A., Roberge, M., **2003**, Plenum Press, New York, 91-101.
6. Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S., Mitchell, G. H.: A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol. Today* **2000**, 16, 427-433.
7. Schlitzer, M.: Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2008**, 341, 149-163.
8. Bray, P. G., Martin, R. E., Tilley, L., Ward, S. A., Kirk, K., Fidock, D. A.: Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol. Microbiol.* **2005**, 56, 323-333.
9. Duraisingh, M. T., Refour, P.: Multiple drug resistance genes in malaria - from epistasis to epidemiology. *Mol. Microbiol.* **2005**, 57, 874-877.
10. Eckstein-Ludwig, U., Webb, R. J., van Goethem, I. D. A., East, J. M., Lee, A. G., Kimura, M., O'Neill, P. M., Bray, P. G., Ward, S. A., Krishna, S.: Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2003**, 424, 957-961.
11. *Guidelines for the treatment of malaria*. World Health Organization, **2006**, Geneva, Switzerland.
12. Vennerstrom, J. L., Arbe-Barnes, S., Brun, R., Charman, S. A., Chiu, F. C. K., Chollet, J., Dong, Y., Dorn, A., Hunziker, D., Matile, H., McIntosh, K., Padmanilayam, M., Santo Tomas, J., Scheurer, C., Scorneaux, B., Tang, Y., Urwyler, H., Wittlin, S., Charman, W. N.: Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature* **2004**, 430, 900-904.
13. *Medicines for Malaria Venture Annual Report 2008*. Medicines for Malaria Venture, **2009**, Geneva, Switzerland.
14. Afonso, A., Hunt, P., Cheesman, S., Alves, A. C., Cunha, C. V., do Rosário, V., Cravo, P.: Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic

- reticulum Ca^{2+} ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 480-489.
15. Yeates, C. L., Batchelor, J. F., Capon, E. C., Cheesman, N. J., Fry, M., Hudson, A. T., Pudney, M., Trimming, H., Woolven, J., Bueno, J. M., Chicharro, J., Fernández, E., Fiandor, J. M., Gargallo-Viola, D., Gómez de las Heras, F., Herreros, E., León, M. L.: Synthesis and structure-activity relationship of 4-pyridones as potential antimalarials. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 2845-2852.
 16. Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Türbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D., Beck, E.: Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **1999**, 285, 1573-1576.
 17. Wiesner, J., Henschker, D., Hutchinson, D. B., Beck, E., Jomaa, H.: In vitro and in vivo synergy of fosmidomycin, a novel antimalarial drug, with clindamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 2889-2894.
 18. Borrmann, S., Adegnik, A. A., Moussavou, F., Oyakhirome, S., Esser, G., Matsiegui, P.-B., Ramharter, M., Lundgren, I., Kombila, M., Issifou, S., Hutchinson, D., Wiesner, J., Jomaa, H., Kremser, P. G.: Short-course regimes of artesunate-fosmidomycin in treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 3749-3754.
 19. Nicolas, O., Margout, D., Taudon, N., Wein, S., Calas, M., Vial, H. J., Bressolle, F. M. M.: Pharmacological properties of a new antimalarial bithiazolium salt, T3, and a corresponding prodrug, TE3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 3631-3639.
 20. Yeramian, P., Meshnick, S. R., Krudsood, S., Chalermrut, K., Silachamroon, U., Tangpukdee, N., Allen, J., Brun, R., Kwiek, J. J., Tidwell, R., Looareesuwan, S.: Efficacy of DB289 in Thai patients with *Plasmodium vivax* or acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* infections. *J. Infect. Dis.* **2005**, 192, 319-322.
 21. Hanks, S. K.: Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* **2003**, 4, 111-118.
 22. Ward, P., Equinet, L., Packer, J., Doerig, C.: Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* **2004**, 5, 79-98.
 23. Anamika, Srinivasan, N., Krupa, A.: A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2005**, 58, 180-189.
 24. Leroy, D., Doerig, C.: Drugging the *Plasmodium falciparum* kinome: the benefits of academia-industry synergy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, 29, 241-249.
 25. Schultz, S. J., Fry, A. M., Sütterlin, C., Ried, T., Nigg, E. A.: Cell cycle-dependent expression of Nek2, a novel human protein kinase related to the NIMA mitotic regulator of *Aspergillus nidulans*. *Cell Growth Differ.* **1994**, 5, 625-635.
 26. Laurent, D., Jullian, V., Parenty, A., Knibiehler, M., Dorin, D., Schmitt, S., Lozach, O., Lebouvier, N., Frostin, M., Alby, F., Maurel, S., Doerig, C., Meijer, L., Sauvain,

- M.: Antimalarial potential of xestoquinone, a protein kinase inhibitor from a Vanuatu marine sponge *Xestospongia* sp. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 4477-4482.
27. Dorin, D., Le Roch, K., Sallicandro, P., Alano, P., Parzy, D., Poulet, P., Meijer, L., Doerig, C.: Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 2600-2608.
28. Meijer, L., Thunnissen, A.-M., White, A. W., Garnier, M., Nikolic, M., Tsai, L.-H., Walter, J., Cleverley, K. E., Salinas, P. C., Wu, Y.-Z., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Kim, S.-H., Pettit, G. R.: Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem. Biol.* **2000**, 7, 51-63.
29. Dorin-Semblat, D., Sicard, A., Doerig, C., Ranford-Cartwright, L., Doerig, C.: Disruption of the *PfPK7* gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot. Cell* **2008**, 7, 279-285.
30. Merckx, A., Echali r, A., Langford, K., Sicard, A., Langsley, G.: Structures of *P. falciparum* protein kinase 7 identify an activation motif and leads for inhibitor design. *Structure* **2008**, 16, 228-238.
31. Bouloc, N., Large, J. M., Smiljanic, E., Whalley, D., Ansell, K. H., Edlin, C. D., Bryans, J. S.: Synthesis and in vitro evaluation of imidazopyridazines as novel inhibitors of the malarial kinase *PfPK7*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5294-5298.
32. Doerig, C., Endicott, J., Chakrabarti, D.: Cyclin-dependent kinase homologues of *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* **2002**, 32, 1575-1585.
33. Ross-Macdonald, P. B., Graeser, R., Kappes, B., Franklin, R., Williamson, D. H.: Isolation and expression of a gene specifying a *cdc2*-like protein kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 220, 693-701.
34. Holton, S., Merckx, A., Burgess, D., Doerig, C., Noble, M., Endicott, J.: Structures of *P. falciparum* *PfPK5* test the CDK regulation paradigm and suggest mechanisms of small molecule inhibition. *Structure* **2003**, 11, 1329-1337.
35. Le Roch, K., Sestier, C., Dorin, D., Waters, N. C., Kappes, B., Chakrabarti, D., Meijer, L., Doerig, C.: Activation of a *Plasmodium falciparum* *cdc2*-related kinase by heterologous p25 and cyclin H. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 8952-8958.
36. Li, J.-L., Robson, K. J. H., Chen, J.-L., Targett, G. A. T., Baker, D. A.: *Pfmrk*, a MO15-related protein kinase from *Plasmodium falciparum*. Gene cloning, sequence, stage-specific expression and chromosome localization. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 241, 805-813.
37. Xiao, Z., Waters, N. C., Woodard, C. L., Li, Z., Li, P.-K.: Design and synthesis of *Pfmrk* inhibitors as potential antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2875-2878.
38. Woodard, C. L., Li, Z., Kathcart, A. K., Terrell, J., Gerena, L., Lopez-Sanchez, M., Kyle, D. E., Bhattacharjee, A. K., Nichols, D. A., Ellis, W., Prigge, S. T., Geyer, J. A., Waters, N. C.: Oxindole-based compounds are selective inhibitors of

- Plasmodium falciparum* cyclin dependent protein kinases. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3877-3882.
39. Geyer, J. A., Keenan, S. M., Woodard, C. L., Thompson, P. A., Gerena, L., Nichols, D. A., Gutteridge, C. E., Waters, N. C.: Selective inhibition of *Pf*rmk, a *Plasmodium falciparum* CDK by antimalarial 1,3-diaryl-2-propenones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1982-1985.
40. Droucheau, E., Primot, A., Thomas, V., Mattei, D., Knockaert, M., Richardson, C., Sallicandro, P., Alano, P., Jafarshad, A., Baratte, B., Kunick, C., Parzy, D., Pearl, L., Doerig, C., Meijer, L.: *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1697, 181-196.
41. Johnson, L. N., Lowe, E. D., Noble, M. E. M., Owen, D. J.: The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett.* **1998**, 430, 1-11.
42. Dajani, R., Fraser, E., Roe, S. M., Young, N., Good, V., Dale, T. C., Pearl, L. H.: Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 β : structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* **2001**, 105, 721-732.
43. Cohen, P., Goedert, M.: GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 479-487.
44. Frame, S., Cohen, P.: GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **2001**, 359, 1-16.
45. Clevers, H.: Wnt/ β -Catenin signaling in development and disease. *Cell* **2006**, 127, 469-480.
46. Coghlan, M. P., Culbert, A. A., Cross, D. A., Corcoran, S., Yates, J. W., Pearce, N. J., Rausch, O. L., Murphy, G. J., Carter, P. S., Roxbee Cox, L., Mills, D., Brown, M. J., Haigh, D., Ward, R. W., Smith, D. G., Murray, K. J., Reith, A. D., Holder, J. C.: Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem. Biol.* **2000**, 7, 793-803.
47. Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y.-Z., Mandelkow, E.-M., Eisenbrand, G., Meijer, L.: Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 β and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 251-260.
48. Wagman, A. S., Johnson, K. W., Bussiere, D. E.: Discovery and development of GSK3 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, 10, 1105-1137.
49. Bhat, R., Xue, Y., Berg, S., Hellberg, S., Ormö, M., Nilsson, Y., Radesäter, A.-C., Jerning, E., Markgren, P.-O., Borgegård, T., Nylöf, M., Giménez-Cassina, A., Hernández, F., Lucas, J. J., Díaz-Nido, J., Avila, J.: Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A011418. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 45937-45945.

50. Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y.-Z., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Senderowicz, A. M., Sausville, E., Kunick, C., Meijer, L.: Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase 3 β and cyclin-dependent kinase5/p25. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5983-5994.
51. Kunick, C., Lauenroth, K., Leost, M., Meijer, L., Lemcke, T.: 1-Azakenpaullone is a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 β . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 413-416.
52. Stukenbrock, H., Mussmann, R., Geese, M., Ferandin, Y., Lozach, O., Lemcke, T., Kegel, S., Lomow, A., Burk, U., Dohrmann, C., Meijer, L., Austen, M., Kunick, C.: 9-Cyano-1-azapaullone (cazpaullone), a glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitor activating pancreatic β cell protection and replication. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 2196-2207.
53. Martinez, A., Alonso, M., Castro, A., Pérez, C., Moreno, F. J.: First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) inhibitors: Thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2003**, 45, 1292-1299.
54. Ghose, A. K., Herbertz, T., Pippin, D. A., Salvino, J. M., Mallamo, J. P.: Knowledge based prediction of ligand binding modes and rational inhibitor design for kinase drug discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5149-5171.
55. Primot, A., Baratte, B., Gompel, M., Borgne, A., Liabeuf, S., Romette, J.-L., Jho, E., Costantini, F., Meijer, L.: Purification of GSK-3 by affinity chromatography on immobilized axin. *Protein Expr. Purif.* **2000**, 20, 394-404.
56. Bertrand, J. A., Thieffine, S., Vulpetti, A., Cristiano, C., Valsasina, B., Knapp, S., Kalisz, H. M., Flocco, M.: Structural characterization of the GSK-3 β active site using selective and non-selective ATP-mimetic inhibitors. *J. Mol. Biol.* **2003**, 333, 393-407.
57. Lambros, C., Vanderberg, J. P.: Synchronisation of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* **1979**, 65, 418-420.
58. Wickert, H., Göttler, W., Krohne, G., Lanzer, M.: Maurer's cleft organization in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: new insights from three-dimensional reconstruction of serial ultrathin sections. *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, 83, 567-582.
59. Tilley, L., Sougrat, R., Lithgow, T., Hanssen, E.: The twists and turns of Maurer's cleft trafficking in *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Traffic* **2008**, 9, 187-197.
60. Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A. S., Young, M. W.: A role for the segment polarity gene *shaggy*/GSK-3 in the Drosophila circadian clock. *Cell* **2001**, 105, 769-779.
61. Barik, S., Taylor, R. E., Chakrabarti, D.: Identification, cloning, mutational analysis of the casein kinase 1 cDNA of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 26132-26138.

62. Takahashi, M., Ritz, J., Cooper, G. M.: Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell* **1985**, 42, 581-588.
63. Attié-Bitach, T., Abitbol, M., Gérard, M., Delezoide, A.-L., Augé, J., Pelet, A., Amiel, J., Pachnis, V., Munnich, A., Lyonnet, S., Vekemans, M.: Expression of the *RET* proto-oncogene in human embryos. *Am. J. Med. Genet.* **1998**, 80, 481-486.
64. Avantaggiato, V., Dathan, N. A., Grieco, M., Fabien, N., Lazzaro, D., Fusco, A., Simeone, A., Santoro, M.: Developmental expression of the *RET* protooncogene. *Cell Growth Differ.* **1994**, 5, 305-311.
65. Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., Pachnis, V.: Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor RET. *Nature* **1994**, 367, 380-383.
66. Enomoto, H., Crawford, P. A., Gorodinsky, A., Heuckeroth, R. O., Johnson, E. M., Jr., Milbrandt, J.: RET signaling is essential for migration, axonal growth and axon guidance of developing sympathetic neurons. *Development* **2001**, 128, 3963-3974.
67. Kjær, S., Ibáñez, C. F.: Identification of a surface for binding to the GDNF-GFR α 1 complex in the first cadherin-like domain of RET. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 47898-47904.
68. Anders, J., Kjær, S., Ibáñez, C. F.: Molecular modeling of the extracellular domain of the RET receptor tyrosine kinase reveals multiple cadherin-like domains and a calcium-binding site. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 35808-35817.
69. Arighi, E., Borrello, M. G., Sariola, H.: RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2005**, 16, 441-467.
70. Takahashi, M., Cooper, G. M.: *Ret* transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* **1987**, 7, 1378-1385.
71. de Groot, J. W. B., Links, T. P., Plukker, J. T. M., Lips, C. J. M., Hofstra, R. M. W.: *RET* as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr. Rev.* **2006**, 27, 535-560.
72. Jhiang, S. M.: The *RET* proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* **2000**, 19, 5590-5597.
73. Mulligan, L. M., Kwok, J. B. J., Healey, C. S., Elsdon, M. J., Eng, C., Gardner, E., Love, D. R., Mole, S. E., Moore, J. K., Papi, L., Ponder, M. A., Telenius, H., Tunnacliffe, A., Ponder, B. A. J.: Germ-line mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* **1993**, 363, 458-460.
74. Carlson, K. M., Dou, S., Chi, D., Scavarda, N., Toshima, K., Jackson, C. E., Wells, S. A., Jr, Goodfellow, P. J., Donis-Keller, H.: Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the *RET* protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 1579-1583.
75. Hofstra, R. M. W., Landsvater, R. M., Ceccherini, I., Stulp, R. P., Stelwagen, T., Luo, Y., Pasini, B., Höppener, J. W. M., Ploos van Amstel, H. K., Romeo, G., Lips,

- C. J. M., Buys, C. H. C. M.: A mutation in the *RET* protooncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* **1994**, 367, 375-376.
76. Ichihara, M., Murakumo, Y., Takahashi, M.: RET and neuroendocrine tumors. *Cancer Lett.* **2004**, 204, 197-211.
77. Marini, F., Falchetti, A., Del Monte, F., Carbonell Sala, S., Tognarini, I., Luzi, E., Brandi, M. L.: Multiple endocrine neoplasia type 2. *Orphanet J. Rare Dis.* **2006**, 1, 45.
78. Carlomagno, F., Vitagliano, D., Guida, T., Napolitano, M., Vecchio, G., Fusco, A., Gazit, A., Levitzki, A., Santoro, M.: The kinase inhibitor PP1 blocks tumorigenesis induced by *RET* oncogenes. *Cancer Res.* **2002**, 62, 1077-1082.
79. Carlomagno, F., Vitagliano, D., Guida, T., Basolo, F., Castellone, M. D., Melillo, R. M., Fusco, A., Santoro, M.: Efficient inhibition of RET/papillary thyroid carcinoma oncogenic kinases by 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[2,3-*d*]pyrimidine (PP2). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, 88, 1897-1902.
80. Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A., Connelly, P. A.: Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 695-701.
81. Lanzi, C., Cassinelli, G., Pensa, T., Cassinis, M., Gambetta, R. A., Borrello, M. G., Menta, E., Pierotti, M. A., Zunino, F.: Inhibition of transforming activity of the RET/PTC1 oncoprotein by a 2-indolinone derivative. *Int. J. Cancer* **2000**, 85, 384-390.
82. Mologni, L., Sala, E., Cazzaniga, S., Rostagno, R., Kuoni, T., Puttini, M., Bain, J., Cleris, L., Redaelli, S., Riva, B., Formelli, F., Scapozza, L., Gambacorti-Passerini, C.: Inhibition of RET tyrosine kinase by SU5416. *J. Mol. Endocrinol.* **2006**, 37, 199-212.
83. Kim, D. W., Jo, Y. S., Jung, H. S., Chung, H. K., Song, J. H., Park, K. C., Park, S. H., Hwang, J. H., Rha, S. Y., Kweon, G. R., Lee, S.-J., Jo, K.-W., Shong, M.: An orally administered multitarget tyrosine kinase inhibitor, SU11248, is a novel potent inhibitor of thyroid oncogenic RET/papillary thyroid cancer kinases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, 91, 4070-4076.
84. Rizzi, E., Cassinelli, G., Dallavalle, S., Lanzi, C., Cincinelli, R., Nannei, R., Cuccuru, G., Zunino, F.: Synthesis and RET protein kinase inhibitory activity of 3-arylureidobenzylidene-indolin-2-ones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 3962-3968.
85. Cincinelli, R., Cassinelli, G., Dallavalle, S., Lanzi, C., Merlini, L., Botta, M., Tuccinardi, T., Martinelli, A., Penco, S., Zunino, F.: Synthesis, modeling, and RET protein kinase inhibitory activity of 3- and 4-substituted β -carboline-1-ones. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7777-7787.
86. Carlomagno, F., Vitagliano, D., Guida, T., Ciardiello, F., Tortora, G., Vecchio, G., Ryan, A. J., Fontanini, G., Fusco, A., Santoro, M.: ZD6474, an orally available

- inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. *Cancer Res.* **2002**, 62, 7284-7290.
87. Plaza-Menacho, I., Mologni, L., Sala, E., Gambacorti-Passerini, C., Magee, A. I., Links, T. P., Hofstra, R. M. W., Barford, D., Isacke, C. M.: Sorafenib functions to potently suppress RET tyrosine kinase activity by direct enzymatic inhibition and promoting RET lysosomal degradation independent of proteasomal targeting. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 29230-29240.
88. de Groot, J. W. B., Plaza-Menacho, I., Schepers, H., Drenth-Diephuis, L. J., Osinga, J., Plukker, J. T. M., Links, T. P., Eggen, B. J. L., Hofstra, R. M. W.: Cellular effects of imatinib on medullary thyroid cancer cells harboring multiple endocrine neoplasia type 2A and 2B associated *RET* mutations. *Surgery* **2006**, 139, 806-814.
89. Strock, C. J., Park, J.-I., Rosen, M., Dionne, C., Ruggeri, B., Jones-Bolin, S., Denmeade, S. R., Ball, D. W., Nelkin, B. D.: CEP-701 and CEP-751 inhibit constitutively activated RET tyrosine kinase activity and block medullary thyroid carcinoma cell growth. *Cancer Res.* **2003**, 63, 5559-5563.
90. Robinett, R. G., Freerman, A. J., Skinner, M. A., Shewchuk, L., Lackey, K.: The discovery of substituted 4-(3-hydroxyanilino)quinolines as potent RET kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 5886-5893.
91. Gilmour, R., Foster, J. E., Sheng, Q., McClain, J. R., Riley, A., Sun, P.-M., Ng, W.-L., Yan, D., Nicas, T. I., Henry, K., Winkler, M. E.: New class of competitive inhibitor of bacterial histidine kinases. *J. Bacteriol.* **2005**, 187, 8196-8200.
92. Morwick, T., Berry, A., Brichwood, J., Cardozo, M., Catron, K., DeTuri, M., Emeigh, J., Homon, C., Hrapchak, M., Jacober, S., Jakes, S., Kaplita, P., Kelly, T. A., Ksiazek, J., Liuzzi, M., Magolda, R., Mao, C., Marshall, D., McNeil, D., Prokopowicz, A., III., Sarko, C., Scouten, E., Sledziona, C., Sun, S., Watrous, J., Wu, J. P., Cywin, C. L.: Evolution of the thienopyridine class of inhibitors of I κ B kinase- β : Part I: Hit-to-lead strategies. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2898-2908.
93. May, B. C. H., Zorn, J. A., Witkop, J., Sherrill, J., Wallace, A. C., Legname, G., Prusiner, S. B., Cohen, F. E.: Structure-activity relationship study of prion inhibition by 2-aminopyridine-3,5-dicarbonitrile-based compounds: parallel synthesis, bioactivity, and in vitro pharmacokinetics. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 65-73.
94. Chang, L. C. W., von Frijtag Drabbe Künzel, J., Mulder-Krieger, T., Spanjersberg, R. F., Roerink, S. F., van den Hout, G., Beukers, M. W., Brussee, J., IJzerman, A. P.: A series of ligands displaying a remarkable agonistic-antagonistic profile at the adenosine A₁ receptor. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2045-2053.
95. Söderholm, A. A., Viiliäinen, J., Lehtovuori, P. T., Eskelinen, H., Roell, D., Baniahmad, A., Nyrönen, T. H.: Computationally identified novel diphenyl- and phenylpyridine androgen receptor antagonist structures. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, 48, 1882-1890.
96. Kambe, S., Saito, K.: Synthetic studies using α,β -unsaturated nitriles: Facile synthesis of pyridine derivatives. *Synthesis* **1981**, 531-533.

97. Evdokimov, N. M., Magedov, I. V., Kireev, A. S., Kornienko, A.: One-step, three-component synthesis of pyridines and 1,4-dihydropyridines with manifold medicinal utility. *Org. Lett.* **2006**, 8, 899-902.
98. Evans, T. L., Kinnard, R. D.: Diaryl sulfide cleavage by sodium sulfide in dipolar aprotic solvents. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 2496-2499.
99. Attia, A. M. E., Ismail, A. E.-H. A. A.: An approach to acyclo-3-deazapyrimidine S-nucleosides via 3,5-dicyano-2(1*H*)-pyridinethiones. *Tetrahedron* **2003**, 59, 1749-1752.
100. Dyachenko, V. D., Litvinov, V. P.: Synthesis and recyclization of 4-aryl-2,6-diamino-3,5-dicyano-4*H*-thiopyrans. *Russ. J. Org. Chem.* **1998**, 34, 557-563.
101. Sharanin, Y. A., Promonenkov, A. M., Shestopalov, A. M., Nesterov, V. N., Melenchuk, S. N., Shklover, V. E., Struchkov, Y. T.: Cyclization of nitriles. XXX. Synthesis, structure and properties of 6-amino-4-aryl-(heteroaryl)-3,5-dicyano-2(1*H*)-pyridinethiones. *Russ. J. Org. Chem.* **1989**, 25, 560-565.
102. Sharanin, Y. A., Shestopalov, A. M., Litvinov, V. P., Klokot, G. V., Mortikov, V. Y., Demerkov, A. S.: Cyclization of nitriles. XXV. Synthesis and reactions of chalcogen-containing 6-amino-3,5-dicyanopyridines. *Russ. J. Org. Chem.* **1988**, 24, 771-776.
103. Sharanin, Y. A., Krivokolysko, S. G., Dyachenko, V. D.: Cyclization reactions of nitriles LIV. Synthesis and properties of 6-amino-4-aryl-3,5-dicyanopyridin-2(1*H*)-ones, the corresponding thiones, the pyridylidenemalononitriles and their hydrogenated analogs. *Russ. J. Org. Chem.* **1994**, 30, 620-626.
104. Zhuang, Q.-Y., Xu, J.-N., Tu, S.-J., Jia, R.-H., Zhang, J.-Y., Li, C.-M., Zhou, D.-X.: A simple one-pot synthesis of 3,5-dicyano-1,2-dihydropyrid-2-ones in aqueous media. *Chin. J. Chem.* **2007**, 25, 1568-1572.
105. Evdokimov, N. M., Kireev, A. S., Yakovenko, A. A., Antipin, M. Y., Magedov, I. V., Kornienko, A.: One-step synthesis of heterocyclic privileged medicinal scaffolds by a multicomponent reaction of malononitrile with aldehydes and thiols. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 3443-3453.
106. Zhu, X.-Q., Zou, H.-L., Yuan, P.-W., Liu, Y., Cao, L., Cheng, J.-P.: A detailed investigation into the oxidation mechanism of Hantzsch 1,4-dihydropyridines by ethyl α -cyanocinnamates and benzylidenemalononitriles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 1857-1861.
107. Brunskill, J. S. A., De, A., Ewing, D. F.: Dimerisation of 3-aryl-2-cyanothioacrylamides. A $[2_s + 4_s]$ cycloaddition to give substituted 3,4-dihydro-2*H*-thiopyrans. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 629-633.
108. Dyachenko, V. D., Krivokolysko, S. G., Sharanin, Y. A., Litvinov, V. P.: New method for the synthesis of 6-amino-4-aryl-3,5-dicyano-3,4-dihydropyridine-2(1*H*)-thiones by recyclization of 4-aryl-2,6-diamino-4*H*-thiopyranes. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1997**, 33, 793-798.

109. Brunton, V. G., Lear, M. J., Robins, D. J., Williamson, S., Workman, P.: Synthesis and antiproliferative activity of tyrphostins containing heteroaromatic moieties. *Anti-Cancer Drug Des.* **1994**, 9, 291-309.
110. Gazit, A., Yaish, P., Gilon, C., Levitzki, A.: Tyrphostins I: Synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 2344-2352.
111. Elnagdi, M. H., Abdelrazek, F. M., Ibrahim, N. S., Erian, A. W.: Studies on alkylheteroaromatic compounds. The reactivity of alkyl polyfunctionally substituted azines towards electrophilic reagents. *Tetrahedron* **1989**, 45, 3597-3604.
112. Abdel-Wadood, F. K., Abdel Monem, M. I., Fahmy, A. M., Geies, A. A.: One-pot synthesis of 1,6-naphthyridines, pyranopyridines and thiopyranopyridines. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* **2008**, 63b, 303-312.
113. Smith, M. B., March, J.: *March's advanced organic chemistry. Reactions, mechanisms, and structure*. 6. Aufl., **2007**, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 1387-1388.
114. Litvinov, V. P., Dotsenko, V. V., Krivokolysko, S. G.: The chemistry of thienopyridines. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2007**, 93, 117-178.
115. Litvinov, V. P., Dotsenko, V. V., Krivokolysko, S. G.: Thienopyridines: synthesis, properties, and biological activity. *Russ. Chem. Bull.* **2005**, 54, 864-904.
116. Krivokolysko, S. G., Dyachenko, V. D.: Esters and nitriles of 3-phenyl(2-furyl)acrylic acid in synthesis of 6-amino-3,5-dicyano-4-phenyl(2-furyl)-2(1H)-pyridinethiones(selenones). *Ukr. Chem. J.* **1996**, 62, 58-62.
117. Dyachenko, V. D., Litvinov, V. P.: Michael reaction in synthesis of 6-amino-4-(4-butoxyphenyl)-3,5-dicyanopyridine-2(1H)-thione. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1998**, 34, 188-194.
118. Gad-Elkareem, M. A. M., Elneairy, M. A. A., Taha, A. M.: Reactions with 3,6-diamino[2,3-*b*]pyridines: synthesis and characterization of several new fused pyridine heterocycles. *Heteroat. Chem.* **2007**, 18, 405-413.
119. Dyachenko, V. D., Litvinov, V. P.: Single stage synthesis of 2-alkylthio(seleno)-4-hetaryl-3-cyano-5,6,7,8-tetrahydroquinolines. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1997**, 33, 1203-1208.
120. Sharanin, Y. A., Shestopalov, A. M., Promonenkov, V. K., Rodinovskaya, L. A.: Cyclization of nitriles. X. Enamino nitriles of the 1,3-dithia-4-cyclohexene series and their recyclization to derivatives of pyridine and thiazole. *Russ. J. Org. Chem.* **1984**, 20, 1402-1414.
121. Nagamatsu, T., Ahmed, S.: The first and reliable synthesis of thieno[2,3-*e*][1,2,4]-triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-5(6H)-ones via their [4,3-*c*]compounds by Dimroth rearrangement. *Heterocycles* **2005**, 65, 2683-2692.
122. Toste, D., McNulty, J., Still, I. W. J.: Formamidinium as a versatile protecting group for primary amines: a mild procedure for hydrolytic removal. *Synth. Commun.* **1994**, 24, 1617-1624.

123. Meyers, A. I., Edwards, P. D., Rieker, W. F., Bailey, T. R.: α -Amino carbanions via formamidines. Alkylation of pyrrolidines, piperidines, and related heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 3270-3276.
124. Jia, C.-S., Zhang, Z., Tu, S.-J., Wang, G.-W.: Rapid and efficient synthesis of poly-substituted quinolines assisted by *p*-toluene sulphonic acid under solvent-free conditions: comparative study of microwave irradiation *versus* conventional heating. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 104-110.
125. Sestili, I., Borioni, A., Mustazza, C., Rodomonte, A., Turchetto, L., Sbraccia, M., Riitano, D., Del Giudice, M. R.: A new synthesis approach of *N*-(4-amino-2-methylquinolin-6-yl)-2-(4-ethylphenoxyethyl)benzamide (JTC-801) and its analogues and their pharmacological evaluation as nociceptin receptor (NOP) antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 1047-1057.
126. Charvát, T., Potáček, M., Marek, J.: Diethyl acetonedicarboxylate - a precursor for the synthesis of new substituted 4-aminoquinolines and fused 4-aminopyridines. *Monatsh. Chem.* **1995**, 126, 333-340.
127. Antaki, H., Petrow, V.: New syntheses of heterocyclic compounds. Part XII. The condensation of ethyl β -aminocrotonate with some cyclic amidines. *J. Chem. Soc.* **1951**, 551-555.
128. Adams, R., Pachter, I. J.: Ultraviolet spectra and structures of the pyrido[1,2-*a*]pyrimidones. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 5491-5497.
129. Shur, M., Israelstam, S. S.: The reaction of amino heterocycles with reactive esters. I. 2-Aminopyridines. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 3015-3020.
130. Suri, O. P., Satti, N. K., Suri, K. A.: Microwave induced acetoacetylation of hetaryl and aryl amines. *Synth. Commun.* **2000**, 30, 3709-3718.
131. Suri, O. P., Suri, K. A., Gupta, B. D., Satti, N. K.: An unequivocal synthesis of 4-methyl-2-oxo-(2*H*)-pyrido[1,2-*a*]pyrimidines. *Synth. Commun.* **2002**, 32, 741-746.
132. Fehnel, E. A.: Friedländer syntheses with *o*-aminoaryl ketones. I. Acid-catalyzed condensations of *o*-aminobenzophenone with ketones. *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 2899-2902.
133. Uff, B. C., Joshi, B. L., Popp, F. D.: Studies with Reissert compounds. Part 17. Mono-Reissert compound formation at the 1,2-position of the quinazoline system. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1986**, 2295-2303.
134. Briel, D.: Synthese von Thieno-Heterocyclen ausgehend von substituierten 5-Methylthio-thiophen-4-carbonitrilen. *Pharmazie* **1998**, 53, 227-231.
135. Khoroshilov, G. E., Demchak, I. V., Emelyanova, M. V.: Regioselective reaction of 2-amino-3-aryl-1-cyanoindolizines with formamide. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2007**, 43, 116-117.
136. Becker, H. G. O., Beckert, R., Berger, W., Domschke, G., Fanghänel, E., Faust, J., Fischer, M., Gentz, F., Gewald, K., Gluch, R., Habicher, W. D., Mayer, R., Metz, P., Müller, K., Pavel, D., Schmidt, H., Schollberg, K., Schwetlick, K., Seiler, E.,

- Zeppenfeld, G.: *Organikum*. 22. Aufl., **2004**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 467.
137. von Itter, F.-A., Vögtle, F.: Carbokationen, Carbanionen und Carbene als Ringbestandteile von Kronenethern. *Chem. Ber.* **1985**, 118, 2300-2313.
138. Castle, L. W., Elmaaty, T. A.: A new method for the synthesis of substituted indeno[1,2-*b*]thiophene with subsequent ring expansion to form substituted thieno[3,2-*c*]quinoline. *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, 43, 629-631.
139. Perepichka, I. F., Kuz'mina, L. G., Perepichka, D. F., Bryce, M. R., Goldenberg, L. M., Popov, A. F., Howard, J. A. K.: Electron acceptors of the fluorene series. 7. 2,7-Dicyano-4,5-dinitro-9-*X*-fluorenes: synthesis, cyclic voltammetry, charge transfer complexation with *N*-propylcarbazole in solution, and x-ray crystal structures of two tetrathiafulvalene complexes. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6484-6493.
140. Takahashi, M., Orihara, T., Sasaki, T., Yamatera, T.: Synthesis of 2*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridines from 1,1,2,2-tetracyanocyclopropanes. *Heterocycles* **1986**, 24, 2857-2862.
141. Boldt, P., Schulz, L., Etzemüller, J.: 1,1-Dicyan-cyclopropane. *Chem. Ber.* **1967**, 100, 1281-1288.
142. Hart, H., Freeman, F.: The synthesis and n.m.r. spectra of some tetracyanocyclopropanes. *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 1220-1222.
143. Pearson, R. G., Dillon, R. L.: Rates of ionization of pseudo acids. IV. Relation between rates and equilibria. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 2439-2443.
144. Allmann, R.: Structural chemistry. In: *The chemistry of the hydrazo, azo and azoxy groups*, Vol 1, Hrsg.: Patai, S., **1975**, John Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto, 23-52.
145. Dyachenko, V. D., Dyachenko, A. D.: Synthesis of 4-alkyl(aryl, hetaryl)-2-thioxo-5,6,7,8-tetrahydroquinoline-3-carbonitriles and their derivatives by cross-recyclization of 4-alkyl(aryl, hetaryl)-2,6-diamino-4*H*-thiopyran-3,5-dicarbonitriles with 4-(cyclohex-1-en-1-yl)morpholine, alkyl halides and cyclohexanone. *Russ. J. Org. Chem.* **2008**, 44, 412-420.
146. Awad, I. M. A., Abdel-Rahman, A. E., Bakhite, E. A.: Synthesis and biological activity of some new heterocyclic quinoline derivatives. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1991**, 57, 293-301.
147. Dyachenko, V. D., Rusanov, E. B.: Isopropylidenemalononitrile in the synthesis of 2-amino-4,6,6-trimethylcyclohexa-2,4-diene-1,1,3-tricarbonitrile, 6-amino-2-(4-methoxybenzoylmethylsulfanyl)-4,4-dimethyl-1,4-dihydro-pyridine-3,5-dicarbonitrile, and fused 2-aminopyrans according to Michael. *Russ. J. Org. Chem.* **2006**, 42, 1374-1379.
148. Möllenbeck, J. M.: Inhibitoren tumorrelevanter Proteinkinasen: Synthese und Struktur-Aktivitätsbeziehungen. *Dissertation Universität Hamburg* **2005**.

149. Ring, D. B., Johnson, K. W., Henriksen, E. J., Nuss, J. M., Goff, D., Kinnick, T. R., Ma, S. T., Reeder, J. W., Samuels, I., Slabiak, T., Wagman, A. S., Hammond, M.-E. W., Harrison, S. D.: Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. *Diabetes* **2003**, 52, 588-595.
150. Aoki, M., Yokota, T., Sugiura, I., Sasaki, C., Hasegawa, T., Okumura, C., Ishiguro, K., Kohno, T., Sugio, S., Matsuzaki, T.: Structural insight into nucleotide recognition in tau-protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β . *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, D60, 439-446.
151. Zhang, H.-C., Boñaga, L. V. R., Ye, H., Derian, C. K., Damiano, B. P., Maryanoff, B. E.: Novel bis(indolyl)maleimide pyridinophanes that are potent, selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2863-2868.
152. Allard, T., Nikolcheva, T., Gong, L., Wang, J., Dunten, P., Avnur, Z., Waters, R., Sun, Q., Skinner, B.: From genetics to therapeutics: the Wnt pathway and osteoporosis. 1r0e PDB entry. **2004**,
153. Meijer, L., Skaltsounis, A.-L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R., Crovace, C., Tarricone, C., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L., Greengard, P.: GSK-3-selective inhibitors derived from tyrian purple indirubins. *Chem. Biol.* **2003**, 10, 1255-1266.
154. Shin, D., Lee, S.-C., Heo, Y.-S., Lee, W.-Y., Cho, Y.-S., Kim, Y. E., Hyun, Y.-L., Cho, J. M., Lee, Y. S., Ro, S.: Design and synthesis of 7-hydroxy-1*H*-benzoimidazole derivatives as novel inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 5686-5689.
155. Kruggel, S., Lemcke, T.: Generation and evaluation of a homology model of PfGSK-3. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2009**, 342, 327-332.
156. Vulpetti, A., Bosotti, R.: Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Il Farmaco* **2004**, 59, 759-765.
157. Klebe, G.: *Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*. 2. Aufl., **2009**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 54-56.
158. Chioua, M., Samadi, A., Soriano, E., Lozach, O., Meijer, L., Marco-Contelles, J.: Synthesis and biological evaluation of 3,6-diamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives as protein kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 4566-4569.
159. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E.: UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605-1612.
160. Kruggel, S., Lemcke, T.: Comparative investigation of the ATP-binding site of human and plasmodial glycogen synthase kinase-3. *QSAR Comb. Sci.* **2009**, 28, 885-890.
161. Schneider, G., Baringhaus, K.-H.: *Molecular design: concepts and applications*. **2008**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 113-114.

162. Allouche, M.: ALK is a novel dependence receptor. Potential implications in development and cancer. *Cell Cycle* **2007**, 6, 1533-1538.
163. Li, R., Morris, S. W.: Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) small-molecule inhibitors for cancer therapy. *Med. Res. Rev.* **2008**, 28, 372-412.
164. Saglio, G., Cilloni, D.: Abl: the prototype of oncogenic fusion proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 2897-2911.
165. Pinilla-Ibarz, J., Bello, C.: Modern approaches to treating chronic myelogenous leukemia. *Curr. Oncol. Rep.* **2008**, 10, 365-371.
166. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S.: The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, 298, 1912-1934.
167. Ishizaka, Y., Ushijima, T., Sugimura, T., Nagao, M.: cDNA cloning and characterization of RET activated in a human papillary thyroid carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 168, 402-408.
168. Tom, B. H., Rutzky, L. P., Jakstys, M. M., Oyasu, R., Kaye, C. I., Kahan, B. D.: Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro* **1976**, 12, 180-191.
169. Knowles, P. P., Murray-Rust, J., Kjaer, S., Scott, R. P., Hanrahan, S., Santoro, M., Ibáñez, C. F., McDonald, N. Q.: Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 33577-33587.
170. Carlomagno, F., Guida, T., Anaganti, S., Vecchio, G., Fusco, A., Ryan, A. J., Billaud, M., Santoro, M.: Disease associated mutations at valine 804 in the RET receptor tyrosine kinase confer resistance to selective kinase inhibitors. *Oncogene* **2004**, 23, 6056-6063.
171. Young, M. A., Shah, N. P., Chao, L. H., Seeliger, M., Milanov, Z. V., Biggs, W. H., Treiber, D. K., Patel, H. K., Zarrinkar, P. P., Lockhart, D. J., Sawyers, C. L., Kuriyan, J.: Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with the aurora kinase inhibitor VX-680. *Cancer Res.* **2006**, 66, 1007-1014.
172. Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 7. Aufl., **2005**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 52.
173. Corson, B. B., Stoughton, R. W.: Reactions of alpha, beta-unsaturated dinitriles. *J. Am. Chem. Soc.* **1928**, 50, 2825-2837.
174. Sharanin, Y. A., Shestopalov, A. M., Mortikov, V. Y., Melenchuk, S. N., Promonenkov, V. K., Zolotarev, B. M., Litvinov, V. P.: Condensed pyridines. Communication 4. The Michael reaction in the synthesis of substituted 3-cyanopyridine-2(1H)-thiones. *Russ. Chem. Bull.* **1986**, 35, 139-144.
175. Matrosova, S. V., Zav'yalova, V. K., Litvinov, V. P., Sharanin, Y. A.: Cyclization reactions of nitriles. *Russ. Chem. Bull.* **1991**, 40, 1456-1459.
176. Kim, Y. C., Hart, H.: Synthesis and nmr spectra of 3-aryl-1,1,2,2-tetracyanocyclopropanes. *Tetrahedron* **1969**, 25, 3869-3877.

177. Elinson, M. N., Feducovich, S. K., Lizunova, T. L., Nikishin, G. I.: Electrochemical transformation of malononitrile and carbonyl compounds into functionally substituted cyclopropanes: electrocatalytic variant of the Wideqvist reaction. *Tetrahedron* **2000**, 56, 3063-3069.
178. Mologni, L., Sala, E., Riva, B., Cesaro, L., Cazzaniga, S., Redaelli, S., Marin, O., Pasqato, N., Donella-Deana, A., Gambacorti-Passerini, C.: Expression, purification, and inhibition of human RET tyrosine kinase. *Protein Expression Purif.* **2005**, 41, 177-185.
179. Donella-Deana, A., Marin, O., Cesaro, L., Gunby, R. H., Ferrarese, A., Coluccia, A. M. L., Tartari, C. J., Mologni, L., Scapozza, L., Gambacorti-Passerini, C., Pinna, L. A.: Unique substrate specificity of anaplastic lymphoma kinase (ALK): development of phosphoacceptor peptides for the assay of ALK activity. *Biochemistry* **2005**, 44, 8533-8542.
180. Claußen, H., Buning, C., Rarey, M., Lengauer, T.: FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations. *J. Mol. Biol.* **2001**, 308, 377-395.
181. Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T.: Multiple automatic base selection: protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, 11, 369-384.
182. Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., Klebe, G.: A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.* **1996**, 261, 470-489.
183. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J.: Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1639-1662.
184. Sanner, M. F.: Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graphics Modell.* **1999**, 17, 57-61.
185. Sybyl 8.0. In. 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144 USA: Tripos International.
186. Gohlke, H., Hendlich, M., Klebe, G.: Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 337-356.
187. Velec, H. F. G., Gohlke, H., Klebe, G.: DrugScore^{CSD} - Knowledge-based scoring function derived from small molecule crystal data with superior recognition rate of near-native ligand poses and better affinity prediction. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6296-6303.

Danksagung

Für die Ermöglichung eines Forschungsaufenthaltes an der Station Biologique de Roscoff (CNRS, Frankreich) sowie für die Durchführung der biologischen Testungen an PfGSK-3 und GSK-3 bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. L. Meijer und seinen Mitarbeitern. Seinem Arbeitskreis, insbesondere Frau M. Ratin, danke ich für die Gastfreundschaft und die schöne Zusammenarbeit.

Für die Durchführung der Kinaseassays an RET, ALK und ABL sowie der Zelltests danke ich Herrn Dr. Luca Mologni von der Università degli Studi di Milano-Bicocca, Monza, Italien.

Mein herzlicher Dank für die Molecular Modeling-Arbeiten gilt Herrn Dr. T. Lemcke und Herrn S. Kruggel, dem ich an dieser Stelle außerdem für die schöne Zusammenarbeit, die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen in Chimera und die damit verbundenen Diskussionen danken möchte.

Bei Herrn Dr. L. Preu, Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung im Allgemeinen und insbesondere bei der Auswertung von NMR-Spektren bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. L. Ernst, Frau Dr. K. Ibrom sowie Frau P. Holba-Schulz (NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig) für die Aufnahme der NMR-Spektren. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. U. Papke, Frau D. Döring und Frau C. Mlynek (Massenspektrometrie-Laboratorium der Chemischen Institute der TU Braunschweig) für die massenspektrometrischen Untersuchungen danken, sowie Herrn Prof. Dr. P. G. Jones und seinen Mitarbeitern (Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig) für die Anfertigung der Röntgenkristallstruktur-Analysen.

Den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, Frau B. Babic, Frau S. Meyer und Frau P. Reich, gilt mein Dank für die Anfertigung der FT-IR-Spektren und der Elementaranalysen sowie für die Probenvorbereitung für die NMR-Experimente. Den Mitarbeitern Herrn K. Hartmann, Herrn

E. Hinz, Herrn F. Riese und Herrn M. Söchtig danke ich für die Versorgung mit Chemikalien und Glasgeräten und ihre technische Unterstützung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für die schöne Zeit und die angenehme Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere gilt mein Dank den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern des Arbeitskreises Frau Dr. S. Kohfeld, Herrn Dr. C. Prühs, Frau Dr. U. Dunkel, Frau Dr. B. Berger, Herrn Dr. H. Stukenbrock, Frau Dr. C. Reichwald, Frau Dr. A.-M. Egert-Schmidt, Frau Dr. A. Becker, Frau S. Schmidt, Frau N. Tolle, Frau J. Ryczak und Frau R. Determann.

Herrn Dr. C. Enge, Frau Dr. A. Becker, Frau Dr. U. Schmid, Herrn S. Kühne und Frau R. Determann danke ich für die freundliche Zusammenarbeit im Praktikum „Chemie einschließlich der Analytik der organischen Arznei-, Hilfs- und Schadstoffe“ des 3. Semesters.

Für die Hilfe beim Lesen der Korrekturen danke ich Frau N. Tolle und Herrn S. Kruggel.

Lebenslauf

Name	Wiebke Brandt
Geboren am	27. März 1981
Geburtsort	Hannover
1987 - 1991	Grundschule am Ebersberg, Springe
1991 - 1993	Orientierungsstufe Nord, Springe
1993 - 2000	Otto-Hahn-Gymnasium, Springe
06/2000	Allgemeine Hochschulreife
10/2000 - 11/2004	Studium der Pharmazie an der TU Braunschweig
01/2005 - 06/2005	Pharmaziepraktikum bei Fa. Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, Salzgitter-Ringelheim
07/2005 - 12/2005	Pharmaziepraktikum in der Apotheke Langer im Elisengang, Oldenburg
01/2006	Approbation als Apothekerin
seit 04/2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. C. Kunick
03/2009	Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik